BOTANIK

Die verholzte Zellwand und ihre Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle Angriffe.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Philosophischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster

vorgelegt von

Aloys Bauer

aus Sponheim bei Bad Kreuznach (Rhld.)

1937

Buchdruckerei Althoff, Münster i. W., Hornstr. 1

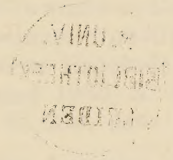
Dekan: Herr Prof. Dr. Trier.

Referent: Herr Prof. Dr. Benecke.

Tage der mündlichen Prüfung: 3. und 4. Dezember 1935.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547223_0140

I. Fragestellung und Ueberblick über die Literatur:

Ein großer Teil der Mikrobiologie des Bodens und der Gewässer befaßt sich mit dem biogenen Abbau der Substanzen abgestorbener Pflanzen. In vielen Fällen herrscht bereits annähernde Klarheit darüber, wie sich diese Vorgänge in den Kreislauf der Stoffe auf Erden eingliedern lassen und welcherlei Mikroorganismen dafür verantwortlich zu machen sind. So ist schon sehr viel und mit gutem Erfolg über die mikrobielle Zersetzung von Eiweißkörpern, Fetten, Kohlehydraten u. a. gearbeitet worden und man weiß darüber Bescheid, wie die Zersetzungsprodukte solcher und vieler anderer Pflanzenstoffe der Ernährung der autotrophen Pflanzen wieder zugeführt werden. Es sei nur an die gewaltige Literatur über die Zersetzung von Zellulose durch Bakterien und Pilze erinnert.

Was nun aber die verholzten Zellmembranen angeht, so ist zwar genau bekannt, daß sie durch viele Pilze, die man als Xylophagen zusammenfassen kann, in sehr verschiedenartiger Weise angegriffen und als Nährstoffe verwertet werden können. Ueber die Einwirkung von Bakterien und Aktinomyceten auf verholzte Zellwandlamellen liegen aber im ganzen Schrifttum nur sehr vereinzelte positive Angaben vor, aus denen sich fast gar keine sicheren Ergebnisse ableiten lassen. (S. u. A. Rippel, 1933, S. 36 und 1936, S. 83, Glathe, 1935, S. 159, Ruschmann, 1936, S. 250, usw.).

Ich habe mir nun die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, ob es vielleicht mit Hilfe elektiver Kulturmethoden gelingt, solche Bakterien oder Strahlenpilze zu züchten, die dazu befähigt, vielleicht sogar darauf angewiesen sind, verholzte Zellwände, die ihnen als einzige Kohlenstoffquelle in der Nährlösung dargeboten werden, anzugreifen und ihre Bestandteile als Nährstoffe zu verwerten. Dabei mußten ganz dieselben Fragestellungen auftauchen, wie bei der Untersuchung der Zerstörung des Holzes durch höhere Pilze: ob nämlich die fraglichen Bakterien nur die Zellulose (und die anderen Kohlehydrate einschl. der Pektinstoffe) aus der verholzten Wand herauslösen und das Lignin, — auf die Dauer oder zunächst — übrig lassen, wie bei der durch Pilze bedingten „Braunfäule“ nach Wehmer, „Destruktionsfäule“ nach Falck, oder ob sie umgekehrt zuerst das Lignin verwerten, sodaß die Zellulose angereichert wird, —

„Weißfäule" nach W e h m e r, „Korrosionsfäule", nach F a l c k, oder endlich, ob die verschiedenen Substanzen, welche verholzte Zellwände aufbauen, dem bakteriellen Angriff etwa gleichzeitig erliegen. (Vgl. dazu besonders W e h m e r, 1914, 1921, 1925, F a l c k, 1919, 1926, 1927, sodann u. A. W a k s m a n n, 1927, I und 1936, C a m p b e l l, 1936).

Das Ergebnis meiner Untersuchungen sei gleich hier vorweggenommen: Es ist mir nicht gelungen, Bakterien ausfindig zu machen, welche obligatorisch oder fakultativ auf die Verarbeitung verholzter Zellwände eingestellt sind. Ich halte damit aber diese Frage noch keineswegs für erledigt; vielleicht werden andere Methoden, als die von mir angewendeten doch zum Ziele führen. Für Untersuchungen, die dieser Frage weiter nachgehen wollen, möchten die in der vorliegenden Arbeit niedergelegten Erfahrungen als Unterlage dienen. —

Wie wichtig die endgültige Aufklärung des genannten Problems ist, zeigt schon die bekannte Tatsache, daß die Hauptmasse aller organischen Substanz auf Erden im Holz der Bäume und Sträucher enthalten ist. Aber auch ein Blick auf die vielen in der Wissenschaft vorliegenden Theorien über die E n t s t e h u n g d e r K o h l e n führt das recht eindringlich vor Augen. Wir wollen daher diese Theorien hier einleitungsweise kurz streifen:

Es handelt sich dabei bekanntlich im Wesentlichen um zwei Fragen: Welches sind die „Grundstoffe" [1]) des Pflanzenkörpers, aus welchen die Kohlen vorwiegend entstanden sind, Lignin, Zellulose oder beide Stoffe bezw. Stoffgruppen? [2]) und in welchen Phasen der Kohlenentstehung sind Mikroorganismen, seien es nun Bakterien oder Pilze, dabei beteiligt?

Manche Theorien, welche die Entstehung der Kohle behandeln, äußern sich gar nicht, oder doch nur ganz beiläufig über

[1]) Ueber den Begriff: Grundstoffe, (Gegensatz: Baustoffe der Kohlen), die ihrer Zeit das Ausgangsmaterial für die betr. Kaustobiolithe geliefert haben, vgl. Z e t z s c h e, 1932, S. 294.

[2]) Leider wird nicht von allen Forschern, die sich an diesen Untersuchungen beteiligen, klar gesagt, ob sie unter „Zellulose" nur den Baustoff nicht verholzter Zellwände verstehen oder auch diejenige Zellulose, welche inkrustiert in verholzten Zellwandlamellen darin steckt. In diesem Falle bleibt also die wichtige Frage unerörtert, ob inkrustierte Zellulose zu den „biologisch resistenten" Teilen abgestorbener Pflanzen im Sinne Fr. F i s c h e r's (s. u.) zu rechnen ist. — Daß der Begriff „Lignin" ein schwankender ist, weil die einen Forscher ihr Lignin chemisch, die andern aber mikroskopisch (histochemisch) kennzeichnen, wird weiter unten noch genauer ausgeführt.

die etwaige Beteiligung von Mikroorganismen. In dem besonders lesenswerten Aufsatze von Bergius (1928) über die Kohlenentstehung, in welchem Zellulose und Lignin als die Urstoffe für die Kohlenbildung angesprochen werden, ist von Mikroorganismen nicht die Rede. Berl und Schmidt (1928—1932. S. auch Berl und Keller, 1933; hier schöne mikroskopische Kohlenbilder), welche die Bedeutung alkalischer Medien für die „Inkohlung" von Zellulose und Lignin in den Vordergrund stellen, sind der Ansicht, daß bei der Entstehung der Kohle Bakterien höchstens eine geringfügige Rolle gespielt haben dürften.

Im Gegensatz dazu ist aber die viel erörterte „Lignintheorie" von Fischer und Schrader (Essen 1921) [3]), wenn auch nur nebenher durch besondere bakteriologische Untersuchungen von ihren Autoren gestützt, so doch biologisch unterbaut. Die beiden Forscher führen nämlich aus, daß die Kohlenbildung mit einem selektiv-biologischen Vorgang eingesetzt habe, indem die absterbenden Pflanzenteile von Bakterien und Pilzen befallen wurden, welche die Zellulose schneller als das Lignin zerstört haben, woraufhin das letztere gemeinsam mit andern „biologisch resistenten" Stoffen (z. B. Wachsen, Harzen) der „Inkohlung" verfallen sei. Sie stützen sich bei ihrer Annahme, daß der wesentlichste Grundstoff der Kohlen das Lignin sei, auf chemische Untersuchungen, indem sie aus der Abnahme des durch starke Schwefelsäure hydrolysierbaren Anteils, sowie aus der relativen Zunahme des Methoxylgehaltes [4]) (Benedikt und Bamberger 1890) auf Schwund der Zellulose schließen [5]); ganz besonders aber weisen sie auf die Tatsache hin, daß mikroskopische Bilder von Hölzern keinerlei Strukturänderung zeigen, auch wenn die Zellulose durch Mikrobentätigkeit so gut wie ganz entfernt ist. — Uebrigens leugnet die Lignintheorie

[3]) Weitere Lit. in dem Verzeichnis am Schlusse dieser Arbeit. Vgl. bes. Fischer und Lieske, 1928. Kurze Zusammenfassung durch Lieske 1934. Zusammenfassende Darstellungen auch bei Kalb, S. 172 und bei Zetzsche, S. 303.

[4]) Nach Kalb können zwei Haupttypen von Hölzern in chemischer Hinsicht unterschieden werden, der Nadelholztyp (Fichte), der c. 16% Methoxyl enthält und beim Abbau an aromatischen Stoffen nur Brenzkatechinabkömmlinge liefert, und der Laubholztyp, (Buche), der c. 22% Methoxyl hat und beim Abbau auch Pyrogallolderivate gibt. —

[5]) Viel zitiert werden in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von Rose und Lisse (1917), denen zufolge bei der Vermoderung von Holz der Zellulose- und Pentosangehalt sinkt, während die alkalilösliche Fraktion und der Methoxylgehalt steigen. Sie finden im vermoderten Fichtenholz 85% Lignin und fast 12% Methoxyl, im nicht vermoderten aber nur 24% Lignin und 4% Methoxyl. — M. Bach (1926) schließt aus ihren Analysen, daß nach Zugabe von Stallmist

unserer Forscher keineswegs ganz die Beteiligung der Zellulose am Kohlenaufbau, doch soll diese nicht die ausschlaggebende Rolle spielen, die ihr von andern Forschern zugeschrieben zu werden pflegte. (Fischer und Schrader, 1921, S. 45.) — Jedenfalls wird nach Fischer und Schrader die Vertorfung des Pflanzenmaterials zunächst durch Bakterientätigkeit herbeigeführt. Ob aber die weiteren Vorgänge, von der Vertorfung bis zur Bildung der fertigen Kohle ebenfalls durch Mikrobentätigkeit mit bedingt sind, diese Frage läßt Fischer offen.

Weyland (1927) vertritt die Meinung, daß als Grundstoff für Kohle auch die Zellulose ganz wesentlich in Frage komme, ihm tritt entgegen als unbedingter Anhänger der Mülheimer Schule Tropsch (1927), der sich auf die anmerkungsweise citierte Arbeit von Bray and Andrews beruft. Marcusson (1925, 1926 und 1927) sagt, daß sich bei der Vermoderung aus Zellulose Oxyzellulose bilde, die dann gemeinsam mit Lignin auf dem Wege über Säuren zur Kohlebildung Veranlassung gebe. Taylor (1927) führt aus, daß die Entstehung der bituminösen Kohle durch bakterielle Zersetzung von Pflanzensubstanz unter bestimmten Bedingungen erfolgt sein dürfte, und zwar bei Sauerstoffausschluß im alkalischen Medium. Die Möglichkeit, wie durch Basenaustausch solche Bedingungen geschaffen werden könnten, wird erörtert. — Berl und Mitarbeiter machen in ihren oben schon genannten Arbeiten gegen die Lignintheorie geltend, daß Zellulose, in alkalischen Medien inkohlt, ein der natürlichen Kohle sehr ähnliches Produkt liefere. Andererseits sind wieder Fuchs und Horn (1931) entschiedene Anhänger der Fischer-Schrader'schen Theorie. Sie schreiben den Bakterien eine wichtige Rolle bei der Kohlenbildung zu. — Von vielen Forschern wird die unterschiedliche Bildung von Braun- und Steinkohle betont. So sagt Donath (1924), daß Braunkohle ligninhaltig sei, Steinkohle aber nicht. Terres (1935) nimmt an, daß durch mikrobiologische Zersetzung aus Zellulose, Proteinstoffen, und vielleicht auch aus Lignin zuerst organische Säuren entstanden sein mögen, — das sei die „primäre biologische Zersetzung", — endlich resultiere Braunkohle als „Restprodukt der aeroben Zersetzung einer Hochwaldvegetation"; dabei wird die Zellulose und das Protein durch Mikroben fast vollständig zersetzt, das übrig bleibende Lignin aber in Humin-

zu Erdboden die Zellulose und die Pentosane im ersteren schnell verschwinden, während Lignin (und Kutine) sich anreichern, sodaß der proz. C-Gehalt während der Zersetzung steigt. Auch Bray and Andrews finden bei Vermoderung eine verhältnismäßige Zunahme des Methoxylgehaltes. (1927).

säuren verwandelt. Steinkohle andererseits soll anaerob entstanden sein; sie stellt, da sie viel Bakterienprotoplasma enthält, ein N-haltiges „Sapropel" dar. — Viele weitere Literatur über diese Fragen gibt Zetzsche. — Ueber Faserkohle vgl. Lieske. (1929) [6])

Unter allen Umständen laden die verschiedenen Arbeiten, die wir eben im Fluge besprochen haben, soweit sie verholztes Pflanzenmaterial als Grundstoff für die Kohlenbildung betrachten und soweit sie es für wahrscheinlich halten, daß nicht nur xylophage Pilze, sondern auch Bakterien für die ersten Stoffumwandlungen verantworlich zu machen sind, dazu ein, nach solchen Bakterien auf Grund systematischer Kulturversuche, die heutigen Tages noch fehlen, zu fahnden. Es wird darauf ankommen, recht verschiedene Kulturbedingungen zu wählen, bei verschiedener Sauerstoffspannung zu züchten, saure und alkalische Nährlösungen heranzuziehen. Auch an die Möglichkeit, daß thermophile, vielleicht sogar orthothermophile Spaltpilze das Holz angreifen können, ist ernsthaft zu denken. Dabei ist natürlich nicht zu vergessen, — das ist von anderer Seite schon häufig betont worden, daß Erfahrungen, die man in kurzer Zeit im Laboratorium sammelt, nicht ohne weiteres übertragen werden dürfen auf biologische Vorgänge, die sich draußen in freier Natur in außerordentlich langen Zeiträumen vollziehen. —

Bevor ich auf meine eigenen Untersuchungen eingehe, scheint es mir nützlich zu sein, die kurzen, mehr beiläufigen Angaben über bakterielle Ligninzersetzung, die sich in der Literatur finden, soweit sie auf ernährungsphysiologischen Versuchen beruhen, behufs Ergänzung der oben gegebenen Zusammenstellung der Literatur über Kohleentstehung, zusammenstellen. (Die große Literatur über Ligninzersetzung durch Pilze lassen wir, unserer Fragestellung entsprechend, bei Seite.) Zunächst ist jedoch eine kurze Kennzeichnung des Begriffes: „Lignin", wie er in der einschlägigen Literatur verwendet wird, unerläßlich.

Bekanntlich redet der Botaniker von „Lignin" immer nur als von einem Bestandteil bestimmter Zellwände, und spricht von Ligninhaltigen Zellwänden nur dann, wenn die betr. Wandlamellen keine oder doch keine saubere Zellulosereaktion (mit

[6]) Auf die Frage nach dem Vorkommen und der Lebenstätigkeit von Bakterien in fertiger Kohle gehen wir hier nicht ein, wir verweisen vielmehr auf Schroeder, 1914, Lieske und Hofmann, 1929, Lieske 1932, Lipman, 1934. Weitere Lit. im Journ. of bact., 1937, Vol. 34, p. 475, 483.

Chlorzinkjod oder Jod und Schwefelsäure) geben, wohl aber die bekannten sog. Holzreaktionen nach Wiesner, Casparis, Mäule usw. Der Botaniker wird also einen bakteriellen „Ligninabbau" nur dann als gesichert ansehen, wenn ihn das mikroskopische Bild davon überzeugt, daß ligninhaltige Zellwände, nachdem sie der Einwirkung von Spaltpilzen ausgesetzt worden sind, diese Holzreaktionen nicht mehr geben, oder allenfalls nur noch in stark abgeschwächtem Maße, oder, wenn solche Zellwände nach der Mikrobenwirkung ganz verschwunden sind, das letztere für den Fall, daß die mit Lignin vereint gewesenen Kohlehydrate gleichfalls der Mikrobentätigkeit zum Opfer gefallen sind. Anders verfährt im allgemeinen der Chemiker: Der von diesem häufig angewandte Ligninbegriff ist gar kein mikroskopischer, vielmehr spricht der Chemiker auf Grund chemischer Analyse von einer Ligninverwertung durch Mikroorganismen dann, wenn in dem der Einwirkung von Bakterien oder Pilzen ausgesetzten Pflanzenmaterial Stoffe, welche der Hydrolyse durch starke Säuren widerstehen, abnehmen, wenn der Methoxylgehalt sinkt, wenn alkalilösliche Bestandteile abnehmen. Das ist z. T. ja schon oben ausgeführt. Meist unterbleibt jede mikroskopische Untersuchung; das Pflanzenmaterial, das Verwendung findet, ist oft sehr inhomogen, und besteht keineswegs immer aus vorwiegend verholztem Gewebe. — Der Unterschied zwischen dem botanischen und dem chemischen Ligninbegriff leuchtet ohne weiteres ein, wenn wir hören, daß viele Chemiker von Lignin auch bei solchen Pflanzen sprechen, bei welchen der botanisch geschulte Histochemiker das Vorkommen von Lignin gar nicht kennt. So sprechen beispielshalber Fischer und Schrader (1921) von einem Gehalt des Torfmooses an Lignin und zwar auf Grund von dessen Methoxylgehalt, der 0,4% OCH_3 beträgt. — Auch der auf diesem Gebiet besonders fruchtbare Forscher Waksman und seine Mitarbeiter charakterisieren ihr Lignin nicht mikroskopisch. Für ihr Lignin ist vielmehr charakteristisch (s. Waksmann and Stevens, 1928): die Extrahierbarkeit durch Alkali, ev. unter Druck, die Fällbarkeit aus alkalischer Lösung durch Säuren, die Resistenz gegen 42% HCl oder 72 bis 80% H_2SO_4, schließlich der Methoxylgehalt. Infolge dessen redet auch Waksman von einem Ligningehalt bei Sphagnum (Waksman and Smith, 1934 u. a. a. O.). Sogar bei Pilzanalysen wird neuerdings von einem Gehalt des Materials an „Lignin" gesprochen (z. B. bei Aspergillus). In diesem Falle wird allerdings der Ausdruck Lignin gelegentlich vorsichtiger Weise durch: „Ligninartige Stoffe" ersetzt. (Porges 1933, Schulz 1937.) Eine durchaus zutreffende Kri-

tik dieser Ausdehnung des Ligninbegriffes auf Thallophyten, die keineswegs den Beifall der Botaniker finden kann, findet sich von chemischer Seite bei Kalb, S. 119, der auch auf den im Vergleich zu höheren Pflanzen geringen Methoxylgehalt des sog. Thallophytenlignins aufmerksam macht.[7]) Daß auch bei Blütenpflanzen gelegentlich ganz ohne Rücksicht auf die mikroskopisch-histochemische Analyse von Lignin gesprochen wird, zeigt ein Aufsatz von Lieske und Winzer (1931). Hier wird gesagt, daß in den Mesophyllinseln des Eichenblattes durch chemische Analyse mehr Lignin nachweisbar sei, als in der Nervatur, während die mikroskopische Betrachtung natürlich das Gegenteil ergibt. (Kritik u. a. bei Hilpert und Wagner, 1935.)

Trotz dieser Bedenken seien nun die wichtigsten Arbeiten experimenteller Art, in denen vom Ligninabbau durch Bakterien oder von der Resistenz des Lignins gegen solche die Rede ist, hier zusammengestellt, obwohl diejenigen Aufsätze, in denen der Begriff lediglich chemisch gefaßt ist, im Grund genommen mit unserem eigenen Thema nur in recht losem Zusammenhang stehen. Es handelt sich um drei Gruppen von Arbeiten:

1. Solche, die auf Ligninverwertung oder mangelnden Ligninabbau auf Grund der chemischen Analyse des Materials vor und nach dem Kulturversuch schließen.

2. Solche, die „künstliches Lignin", auf diese oder jene Weise aus Holz gewonnen, als Nährstoff für Bakterien verwenden. Da es offenbar bis jetzt nie gelungen ist, Lignin im unveränderten, nativen Zustand zu gewinnen, haben Versuche mit künstlichem Lignin offenbar nur unter der Voraussetzung ökologisches Interesse, daß auch in natura Stoffe vorkommen können, etwa beim Abbau verholzter Membranen durch Mikroben, welche mit den Ligninpräparaten, die zu den Versuchen verwendet werden, identisch oder ihnen doch sehr ähnlich sind.

3. Solche Arbeiten, und deren gibt es nur sehr wenige, die auf mikroskopische Beobachtungen ihre Schlüsse über bakterielle Ligninverwertung gründen.

[7]) Daß es sehr bedenklich ist, aus einer ohnehin oft nur geringfügigen Aenderung des Methoxylgehaltes auf eine Aenderung des Ligningehaltes zu schließen, ist oft hervorgehoben worden. — Nicht nur bei der Ligninzersetzung sondern auch beim Pektinabbau muß der Methoxylgehalt des Materials sinken, doch kann der Methylalkohol des Pektins leicht durch verdünnte Lauge abgespalten werden, was für den des Lignins nicht zutrifft (s. d. Lit. bei Kalb, S. 157).

Anhangsweise wird auch auf einige Arbeiten, die Holzextrakte als Nährlösungen verwenden, hingewiesen werden. Schrader, der oben schon genannte Mitarbeiter F. Fischer's (1923) stellte sich Nährlösungen her, welche Filtrierpapier, Zeitungspapier, frisches und altes Kiefernholz, Torfmoos oder endlich Lignin, welches nach Willstätter durch Aufschluß von Holz mittels hochkonzentrierter Salzsäure dargestellt war, enthielten und mit Gartenerde beimpft wurden. In den mit Torf oder mit Lignin versehenen Lösungen trat während einer Versuchsdauer von 25 Tagen keinerlei Gärung ein. (S. Molisch, 1932).

Rose und Lisse (1917, s. oben) finden Unzugänglichkeit des Kiefernholzes für Mikroorganismen, im Gegensatz zu Zellulose und zu Pentosanen. — Pringsheim und Fuchs (1923) stellten sich Lignin durch „alkalische Kochung" aus Kiefernholz her. Das Präparat enthielt noch Pentosane. Benutzten sie es als C-quelle in Nährlösungen, die sie mit Erdboden impften, so stellten sie, wie sie glauben, eine Abnahme des Methoxylgehaltes durch Bakterientätigkeit fest.

Demme (1932) stellte nach verschiedenen Methoden Ligninpräparate her. Aus der Abnahme des Methoxylgehaltes und aus der Farbänderung schloß er auf einen bakteriellen Abbau des Lignins in den Kulturen, welche mit Alkaliligninsalz versehen waren. Er will Bakterien dafür verantwortlich machen, die er aber nicht für spezifische Ligninzerstörer hält, da in Kulturen mit Säurelignin keine Entwicklung von Bakterien festzustellen war. Eine nähere Charakteristik der Bakterien fehlt, aber es findet sich die Angabe, daß das Lignin nur dann angegriffen wird, wenn mehrere miteinander in Symbiose lebende Bakterien zugegen sind. –

Aus den äußerst zahlreichen Arbeiten von Waksman, die er z. T. mit verschiedenen Mitarbeitern verfaßt hat, geht hervor, daß Lignin zu den biologisch resistentesten Körpern gehört (Waksman and Tenney, 1927 und 1928), daß es aber gleichwohl von einigen Bakterien und Aktinomyceten verwertet werden kann (Tenney and Waksman, 1929). Da es ganz und gar unmöglich ist, auf die vielen Einzelheiten in den Veröffentlichungen der Waksman'schen Schule hier einzugehen, geben wir nur einen kurzen Ueberblick über die Ansichten der Amerikanischen Forscher, zunächst nach Waksman's Darstellung von 1935: Waksman's Theorie stützt sich auf die Rolle der Mikroorganismen bei der Zersetzung pflanzlicher (und tierischer) Rückstände. Einige Bestandteile, vor allem

die Kohlehydrate werden schnell zersetzt, während andere, besonders die Lignine widerstandsfähiger sind und sich daher anreichern. (Die nahe Verwandtschaft mit den oben skizzierten Anschauungen von Fischer und Schrader ist klar ersichtlich.) Aber auch diese widerstandsfähigeren Komplexe werden allmählich durch die Einwirkung von Mikroorganismen, sowie durch chemische Vorgänge — beeinflußt.[8]) — Zugleich mit den Abbauprozessen bewirken aber die Mikroorganismen auch umfangreiche Aufbauprozesse, nämlich Bildung mikrobieller Zellsubstanz. Indem dieses Eiweiß mit den Ligninen und ihren Abkömmlingen reagiert, wird es widerstandsfähiger gegen Zersetzung. Die Lignine und veränderten Ligninkomplexe stellen zusammen mit den Proteinen den größeren Teil des Humus dar.[9])

Eine nähere Charakteristik der Lignin abbauenden Bakterien wird von Waksman nicht gegeben. Doch vielfach wird auf die Bedeutung von Strahlenpilzen für die Zersetzung des Lignins hingewiesen. Strohfraktionen, welche in Alkali löslich sind und aus diesen Lösungen mit Säure gefällt werden, welche also „Lignine neben bestimmten Pentosanen" enthalten, werden von Actinomyces viridochromogenus Krainsky stark angegriffen. „This is a result of the fact, that this organism is actually capable of decomposing lignins in nature." (Waksman 1926. p. 330.) 1931 nennt Waksman einen Actinomyces, der mit A. violaceus Krainsky nahe verwandt ist und der das Lignin des Weizenstrohs langsam, schnell dagegen Zellulose und Fette zerstören kann.[10]) — Anaerobe Bakterien zerstören nach Waksman das Lignin als solches nicht, verringern aber seinen Gehalt an Methoxyl. Mit andern Worten: Bei aerobem Angriff

---

[8]) s. dazu Waksman and Hutchings, 1936. Der allmähliche Uebergang von Lignin in Humus ist begleitet von Methoxylverlust, von oxydativer Schwärzung, von Kombination mit Proteinen, von einer Zunahme der Alkalilöslichkeit, (Zunahme der „Huminsäuren").

[9]) s. dazu auch Springer, 1936, Scheffer 1936 und Rippel, 1936. Ueber Bindung N-haltiger Stoffe an Lignin vgl. auch Page, 1932 und Sandhoff, 1931. Nach Scheffer (1936, S. 426) hat Sandhoff festgestellt, daß Glykokoll nicht durch Lignin festgelegt wird, wohl aber Aminosäuren mit größerem Molekül und Eiweißstoffe. „Die mikrobiologische Zersetzung erfolgt um so langsamer, je höher der Lignin- und je geringer der Proteingehalt ist."

[10]) Nachtr. Anm. Auch 1937, Soil Sc., Vol. 43, p. 77 sagt Waksman, daß Ligninzersetzung nur dann zu beobachten war, wenn Aktinomyceten in dem Mikrobengemisch vorhanden waren, welche das Pflanzenmaterial zersetzten. – Ueber die Frage der Ligninzersetzung durch Vertreter der Gattung Micromonospora s. Jensen, H. L., 1930.

wird Lignin als solches zerstört, bei anaerobem aber nur sein Methoxylgehalt (Waksman and Tenney 1930, W. and Smith, 1934, 1935. S. auch Boruff und Mitarb., 1934).

In den soeben besprochenen Studien von Waksman und seiner Schule ist unter „Lignin" immer nur solches zu verstehen, wie es im natürlichen Zustand in verschiedenem pflanzlichem Material vorkommt, und durch die obengenannten chemischen Methoden gefaßt werden kann. Lignin, welches durch chemische Methoden isoliert ist, („prepared in purified state") ist aber nach Waksman und Mitarbeitern im Allgemeinen ganz und gar unangreifbar seitens der Mikroorganismen (Waksman and Hutchings, 1936. Vgl. auch Norman, 1935 u. 1936). Bestreut man (Waksman and Hutchings, 1936, p. 120) Kieselsäureplatten mit Lignin und impft man mit Erdboden, so entwickeln sich massenhaft Bakterien, die aber, falls sie dann in Reinkultur gezüchtet werden, Lignin nicht angreifen. Nur Phenollignin (Darstellung s. i. Or.) wird durch bestimmte nicht näher beschriebene Bakterien, (also nicht nur durch Pilze) zerstört. Bei Waksman and Hutchings 1936 findet sich auch die in mikrobiologischer Hinsicht wichtige Feststellung, daß auch solches Lignin, welches in natura durch die Einwirkung zelluloselösender Bakterien aus Holz entstanden ist, biologisch resistent sein soll.

Wenn Ligningehalt im Erdboden die Eiweißzersetzung durch Bakterien hemmt, so ist das, wie Waksman weiter ausführt, nicht etwa auf seine toxische Wirkung zurückzuführen, sondern vielmehr darauf, daß, wie oben schon erwähnt, Lignin und Zellulose zu sehr resistenten Verbindungen zusammentreten. (Waksman and Hutchings, 1935.) In vielen Fällen werden mikrobielle Leistungen bestimmter Art durch Ligningehalt sogar gefördert. Die Funktion des Lignins und seine Einwirkung auf das Mikroorganismenleben ist also eine recht verschiedenartige. Es wirkt als Puffer bei der Absorption von Ammoniak und indem es Protein fixiert. (Waksman and Hutchings, 1935) „The function of the lignin consists in the action of a buffer for the absorption of NH_3 and in fixing of protein."

Auch in den Arbeiten von Phillips u. Mitarbeitern (z. B. 1930, 1934 und 1935) wird Lignin als besonders resistenter Bestandteil der Pflanzen hingestellt. Gleichwohl aber nimmt es sowohl bei Sauerstoffzutritt, als auch bei Sauerstoffabschluß unter mikrobiellem Einfluß ab. Lignin des Maiskolbens soll anaerob zersetzt werden, während isoliertes Lignin anaerob nicht vergoren werden kann. (Vgl. dazu die oben genannten Arbeiten von Waksman.)

Einige Untersuchungen betreffen auch die Frage, ob in den tropischen Böden, ariden und humiden, die Resistenz des Lignins gegenüber Mikroorganismen geringer ist, als in gemäßigten Klimaten. Tatsächlich scheint dem so zu sein, denn Oberholzer (1936, vgl. auch Duthie 1937) zeigt, daß in den Tropen eine lebhaftere Zersetzung des Lignins nachweisbar ist als in unseren Breiten. Ob das auf einer aktiveren tropischen Mikroflora (Bazillen und Strahlenpilzen) beruht, oder auf dem stärkeren Alkalinitätsgrade der Böden, bleibt vorläufig zweifelhaft.

Außerordentlich viele, großenteils von praktischen Gesichtspunkten geleitete Arbeiten handeln von der Frage der Angreifbarkeit verschiedener pflanzlicher Zellwandsubstanzen durch Darmbakterien der Tiere. Wir müssen uns darauf beschränken, einige Angaben aus diesem Teilgebiet hier anzuführen.

Eine wahre Fundgrube von Mitteilungen über die Verdaulichkeit der verschiedenen Zellwände, auch der verholzten, stellen die Arbeiten von Haberlandt dar (vgl. Haberlandt, 1915 und 1918), sodann Haberlandt und Zuntz 1915). Allerdings finden sich nur wenige bakteriologische Angaben und nur wenige histochemische Untersuchungen.

Nach Haberlandt (1915) werden im Verdauungskanal der Rinder und der Pferde verholzte Zellwände nicht oder kaum angegriffen; nur in seltenen Fällen zeigen sie schwache Korrosionserscheinungen nach dem Passieren des Darmkanals und die Phlorogluzinreaktion bleibt positiv. 1918 schreibt Haberlandt, daß verholzte Zellwände doch in höherem Grade verdaulich seien, als man bis dahin angenommen hatte. Libriformzellen zeigen oft Korrosionen, wenn sie durch den Verdauungstraktus hindurchgegangen sind. Es wurde auch (Haberlandt, 1918) dasjenige Material mikroskopisch untersucht, welches Rubner (1916) zu seinen Versuchen über die Ausnutzung von Haselnußschalen im Verdauungskanal des Hundes benutzt hatte, und welches eine auffallend hohe Ausnutzbarkeit ergeben hatte. Die Sklerenchymzellen der Haselnußschalen werden im Verdauungstraktus des Hundes ausgiebig korrodiert. Die Zellwandverdickungen der Gefäße und Tracheiden, insbesondere die Spiralleisten, bleiben aber fast immer unverändert; sie zeigten nur in einem einzigen Falle Korrosionserscheinungen.

Viele weitere Angaben über diese Frage finden sich z. B. bei Fuchs (1926), s. Molisch, (1932), oder bei Kalb, S. 1475 und an vielen andern Orten.

Auch in den Arbeiten Hennebergs (1922) über die Darmflora des Menschen finden sich gelegentliche Angaben über die Resistenz verholzter Zellwände gegen Bakterien. — Paloheimo (1925 u. 1929) findet, daß Lignin, welches er auf geeignete Weise (s. d. Orig.) durch Säurehydrolyse gewonnen hatte, „in keiner Weise durch Bakterientätigkeit im Darmkanal der Wiederkäuer beeinflußt wird." S. u. A. auch Woodman and Stewart (1932). Von den Forschern, welche sich mit dem Studium der Symbiose zwischen Tieren und Bakterien befaßt haben, (s. z. B. Buchner, 1932, Schwartz 1932 oder Müller, 1934) ist die Vermutung ausgesprochen worden, daß durch die Tätigkeit der im Darme von holzfressenden Larven hausenden Bakterien bei der Verdauung das Lignin sich anreichere, also nicht verdaut werden könne, während die Zellulose aus dem Holze herausgelöst werde. Wegen aller Einzelheiten muß auf die Originalarbeiten verwiesen werden. —

Schließlich sei noch erwähnt, daß nach Pierantoni (1936, cit. nach Schmucker i. Fortschr. d. Bot., 1937, S. 343) symbiotische Protozoen des Termitendarms Bakterien enthalten, welche „Holz und Zellulose" aufschließen, und die löslich gemachten Stoffe dem Gesamtwirt zuführen.

Wir wenden uns nun den Arbeiten Baker's und Martin's (1931, 1933 u. 1937) zu.

Baker beschreibt 1931 „kokkoide Mikroorganismen", welche am Abbau von Zellwandstoffen beteiligt sind. Im Caecum des Meerschweinchens aber auch an andern Standorten fanden sich Kokken, welche Aehnlichkeit hatten mit dem von Henneberg (l. c.) aus dem Wiederkäuerdarm beschriebenen Micrococcus pygmaeus. Es waren gramnegative Kokken, die mit Jodlösungen keine Amylodextrinreaktion gaben. Sie griffen die Mittellamellen (Pektinstoffe) und reine Zellulose an und, wie es schien, auch das Lignin der Wände von Tracheiden Gefäßen und sklerenchymatischen Elementen. Tracheiden waren oft ganz von solchen Kokken erfüllt und ihre Wände und die anderer verholzter Zellen mit charakteristischen Erosionsstellen („fossae" und „lacunae") bedeckt. - 1933 wird die bakterielle Mikroflora des Meerschweinchencaecums genau geschildert und die Möglichkeit erörtert, daß kokkoide Zellen, die sich finden, in den Entwicklungsgang von Cytophaga gehören. Die Frage nach dem Angriff verholzter Zellwände wird in dieser Mitteilung nicht gestreift, wohl aber wieder in der Arbeit von Baker und Martin, 1937, in welcher die „Jodophile" Flora des Caecums des Kaninchens mit besonderer Berücksichtigung des Ab-

baues von Zellwandsubstanzen behandelt wird. Hier wird neben andern Bakterien wieder der kleine Micrococcus Henneb. geschildert, als sehr kleiner Organismus von c. 0,4 My Durchmesser, der sich mit Jod „malvenfarbig" (blue-mauve) färbte. (Also anders als im Meerschweinchencaecum, s. ob.). Weiter wird gesagt, daß dieser wichtige Organismus besonders aktiv sei bei der Zerstörung sklerenchymatischer Elemente, in und auf welchem er oft in großer Menge sitzt. Später, S. 29, heißt es, daß es außer Zweifel sei, daß Pektinstoffe, Hemizellulosen und Zellulose den Bakterien zum Opfer fallen, daß es jedoch zweifelhaft bleiben müsse, ob die Ligninkomponenten der Zellwände tatsächlich bakteriell abgebaut werden. Zwar schwindet die Phlorogluzinreaktion, aber es ist möglich, daß dieser Schwund auch durch chemische Einflüsse, unabhängig von Mikroorganismentätigkeit erfolgt. —

Sehr beachtenswert ist der auch von Stapp und Bortels (1934) mit gutem Grund gezogene Schluß, daß die von Baker beschriebenen Zellwandzerstörer z. T. mit einer mikrocystenbildenden Cytophaga, z. T. vielleicht auch mit Itersonia ferruginea identisch sind. Auch die von Henneberg (1922) beschriebenen und mit besonderen Artnamen belegten „Kokken" aus dem Darm des Menschen stellen nach unsern beiden Forschern vielleicht nichts anderes dar, als Mikrocysten irgend einer Cytophaga.

Wir werfen noch einen kurzen Blick auf zwei Arbeiten, welche zwar nicht vom Angriff von Bakterien auf verholzte Zellwände handeln, wohl aber von dem Verhalten von Bakterien gegenüber solchen Stoffen, welche mittels Wasser aus verholzten Geweben extrahiert werden können.

Potter (1904) zog Holz der Roßkastanie mit Wasser aus. In dem Extrakt war mittels der Phlorogluzin- oder mittels der Thallinreaktion Vanillin nachweisbar, daneben waren natürlich noch andere nicht näher definierte Stoffe darin enthalten. In diesem Extrakt konnten sich nun Bakterien entwickeln, und zwar in dem Extrakt von Splintholz besser als in dem von Kernholz; das letztere enthielt wahrscheinlich mehr schädliche Stoffe. Parallel mit der Entwicklung der Bakterien ging das Schwinden der Reaktion auf Vanillin. Auch Bacillus subtilis entwickelte sich unter Abnahme der Vanillinreaktion in den Extrakten, wenn diese mit Reinkulturen geimpft wurden. Die spontan entwickelten Bakterien werden nicht genauer charakterisiert. Die aus dem Splintholzextrakt isolierten verflüssigten die Gelatine, die aus dem Kernholzextrakt stammenden aber nicht. —

Malenkovic (1905) stellte sich aus Kiefernholzsägemehl einen wässerigen Extrakt her. Der Rückstand, die „Holzsubstanz", konnte von Bakterien nicht angegriffen werden, wohl aber von Pilzen. Der Extrakt jedoch konnte Bakterien als Nährlösung dienen. An der Holzsubstanz selbst setzte Bakterientätigkeit erst dann ein, wenn vorher eine Zersetzung durch Pilze eingetreten war und gewisse antiseptisch wirkende Spaltungsprodukte entfernt worden waren. Diese Ausführungen klingen an die später von Molisch (1932) energisch vertretene Anschauung an, daß das Lignin die Hauptaufgabe habe, verholzte Gewebe widerstandsfähig gegen Fäulnis zu machen. —

Ein Rückblick auf die eben besprochene Literatur zeigt ein für den Bakteriologen, vielleicht weniger für den Chemiker, äußerst mageres Ergebnis, selbst für den Fall, daß mir vielleicht die eine oder die andere Angabe in der großen Literatur entgangen sein sollte. Es ist nichts Genaues über Morphologie und Physiologie von Bakterien oder Strahlenpilzen bekannt, welche das Lignin verholzter Pflanzenzellwände verwerten können. Ja es ist durchaus möglich, daß solche gar nicht existieren. Es scheint auch, daß keine eingehenden Beobachtungen darüber vorliegen, ob Zellulose lösende Bakterien auch diejenige Zellulose oder andere Polysaccharide, welche, vom Lignin inkrustiert, in verholzten Lamellen sich vorfinden, herauslösen und dann weiter verarbeiten können.

II. Morphologie und Histochemie des von mir für die Ernährungsversuche verwendeten Holzes.

Ein ganz großer Teil der oben erwähnten Untersuchungen über den bakteriellen Ligninabbau ist mit Hilfe von solchem Material ausgeführt worden, welches recht inhomogen war und aus ganz verschiedenen Geweben der betr. Pflanzen bestand, keineswegs ausschließlich oder auch nur vorwiegend aus verholzten Zellwänden. Für meine Fragestellung kam es aber vor allem darauf an, solches Material als Kohlenstoffquelle für meine Nährlösungen zu verwenden, welches möglichst ausschließlich aus verholzten Zellwandlamellen besteht. Ich verwendete für die meisten meiner Versuche Kirschkerne. Sie wurden reifen Kirschen entnommen, von Fleischresten sorgfältig gesäubert und gründlich mit Wasser gewaschen. Dann wurde jeder einzelne Stein für sich geknackt, die Samen sorgfältig entfernt. So blieben nur reine, größere oder kleinere Holzsplitter übrig, die dann

abermals äußerst gründlich mit dest. Wasser gewaschen und endlich getrocknet aufbewahrt wurden. Die Splitter wurden dann für die Versuche entweder als solche verwendet oder aber vorher zu einem feinen Pulver zermahlen.[11])

Obwohl es mir, wie eingangs schon gesagt, versagt geblieben ist, xylophage Bakterien zu finden, möchte ich hier doch die morphologischen und histochemischen Eigenarten des von mir verwendeten Materials recht genau schildern, schon mit Rücksicht auf etwaige spätere Untersuchungen. Es ist ja bekannt, daß die verschiedenen Hölzer sich mehr oder minder voneinander unterscheiden; was für den biologischen Abbau von Kirschkernen gilt, braucht für anderes verholztes Material nicht zuzutreffen, weshalb mir eine genaue Schilderung der ersteren unerläßlich zu sein schien. Da alle histochemischen Reaktionen und erst recht die Angreifbarkeit durch Mikroorganismen weitgehend vom Feinheitsgrade des Pulvers abhängen, wie z. B. schon Lüdtke (1928) ausführt, erwähne ich, daß in dem von mir verwendeten Pulver die größten Klumpen, die aber nur ganz vereinzelt vorkamen, einen Durchmesser von etwa 400 My besaßen, viele hatten einen Durchmesser von 250 My; diese größeren Klumpen bestanden aus Zellgruppen. Die Hauptmasse des Pulvers bestand aus kleineren Teilchen, die etwa die Größe einer Steinzelle, ca. 40 bis 80 My Durchmesser hatten. Außerdem waren viele Zellwandsplitter, also zertrümmerte Steinzellen zugegen, deren Durchmesser vier bis acht My betrug. Für etwaige spätere Fortführung solcher Versuche dürfte es sehr empfehlenswert sein, mit einem noch viel feineren Pulver zu arbeiten. —

Die Splitter waren ohne besondere Vorbehandlung so hart, daß es sehr schwer war, mit dem Rasiermesser brauchbare Schnitte für die mikroskopische Untersuchung anzufertigen. Das beruhte aber nicht etwa auf einem besonders hohen Gehalt an Mineralstoffen, denn die Aschenmenge belief sich nur auf 0,43 bis 0,46% des Trockengewichtes. (Haselnußschalen haben nach Rubner (1916) 1,36% Asche.) Die Asche bestand zum großen Teil aus Calciumkarbonat; Kieselsäure konnte ich nicht darin nachweisen. Es empfahl sich, soweit es sich nicht um histochemische, sondern um morphologische Studien handelte, das Material vorher aufzuweichen, z. B. mit einer alkoholischen Phenollösung (Kisser 1931) oder durch längere Behandlung mit Perhydrol oder mit Natronlauge. (s. u.)

[11]) Das von Rubner (S. S. 15) für seine Verdauungsversuche verwendete Pulver von Haselnußschalen dürfte mit meinem Kirschkernmaterial viel Aehnlichkeit gehabt haben. —

Zunächst sei in morphologischer Hinsicht gesagt, daß das Material insofern nicht ganz einheitlich ist, als es zwar der Hauptsache nach aus polyedrischen, größeren oder kleineren, dickwandigen Steinzellen mit Tüpfelung der Wände besteht, daß aber die innersten Partien der Schalen aus gleichfalls dickwandigen, getüpfelten Stabzellen, d. h. Fasern, aufgebaut sind, die senkrecht zur Längsachse der Blüte gestreckt und 100 bis 200 My lang, etwa 30 My breit sind. [12])

Bevor ich auf meine eigenen histochemischen Untersuchungen des Kirschkernmaterials eingehe, will ich nun ganz kurz einige Anschauungen chemischer Forscher über den Aufbau verholzter Zellwandlamellen besprechen, aber nur insoweit sie auch für die Frage einer biologischen Angreifbarkeit solcher Lamellen von Bedeutung sind.

Ich halte mich an Freudenberg und Mitarbeiter (1932). Die Zellulose besteht aus „untersten Einheiten", das sind Ketten von hundert bis zweihundert Glukosemolekülen, die parallel miteinander zu Bündeln vereint, die Micellen bilden. Auch die Micellen sind zu Reihen (Bündeln) vereinigt, die aber mikroskopisch noch nicht sichtbar sind. Diese Micellenbündel sind dann ihrerseits zu den „Fibrillen" vereinigt; diese Fibrillen sind die kleinsten mikroskopisch eben noch sichtbaren Einheiten, die z. B. nach Behandlung mit bestimmten Chemikalien oder nach einem durch Mikroorganismen erfolgten Angriff deutlich im mikroskopischen Bild hervortreten.

In der verholzten Zellwandlamelle sind nun die Micellenreihen, die also, mikroskopisch nicht sichtbar, der Größenordnung nach zwischen Micellen und Fibrillen liegen, von Lignin umgeben. An der Peripherie der Micellenreihen wächst das Lignin vielleicht auch in die Räume zwischen den Micellenreihen hinein. Es dringt aber nicht zwischen die Glukoseketten der Micellen ein. Das Lignin „durchwächst somit das Zellulosegerüst vollständig und vergleichbar einem Pilzgeflecht". [13])

Das Lignin selbst besteht nun aus verschieden langen Kettenmolekülen; es ist nach Freudenberg ein „heteropolymeres Gebilde", größtenteils phenolartig-aromatisch, mit völlig

[12]) Der Stickstoffgehalt des Materials belief sich auf etwa 0,1% des Trockengewichtes.

[13]) Vgl. besonders die überaus anschauliche Darstellung bei Freudenberg und Mitarbeitern, (1929).
Wedekind (1936) sagt: „Das Lignin ist als die Kittsubstanz anzusehen, welche die Gesamtzellulose starr und fest macht. Es ist demnach nicht etwa dem Knochengerüst der Wirbeltiere zu vergleichen, sondern eher dem Mörtel, der einen Bau verfestigt."

durch Verätherung abgedeckten Phenolhydroxylgruppen. „In der Annahme eines in der Seitenkette hydroxylierten Propylbrenzkatechins als Zwischenprodukt der Ligninsynthese gibt Freudenberg eine Erweiterung der Klason'schen Hypothese, die das Lignin ein Polymerisationsprodukt des Koniferylalkohols bezw. -aldehyds nennt. (Kalb, S. 1472.) [14])

Nach der wohl sicher zutreffenden Ansicht der Chemiker gelingt es bis heute nicht, auf praeparativem Wege unverändertes Lignin zu gewinnen, sondern nur „Ligninpräparate", (Kalb, S. 1457), die sich dem nativen Lignin mehr oder minder annähern. Wir stehen hier vor einer für den Mikrobiologen besonders wichtigen Frage: inwieweit Lignin in natura wirklich existiert, inwieweit es nur ein Reaktionsprodukt chemischer Eingriffe ist. Am extremsten ist dabei wohl Hilpert und seine Schule, (1934 u. 1935) und andere Forscher, die sich ihm anschließen (z. B. Friesen, 1935).

Hilpert schließt aus Versuchen über Verharzung von Zuckern durch Säuren bei erhöhter Temperatur, daß das Lignin (Buchenlignin), wie es bisher von den Chemikern untersucht worden ist, gar nicht vorgebildet sei, vielmehr sollen unter den Bedingungen, unter denen man Lignin gemeiniglich darstellt, d. h. durch Säurewirkung, auch aus Kohlehydraten Niederschläge (unlösliche Verharzungsprodukte) entstehen, welche Lignin vortäuschen. Intermediärprodukte bei der Bildung solcher Verharzungsprodukte sollen Zelluloseanhydride sein. – Im Stroh seien überhaupt nur Kohlehydrate als Wandstoffe enthalten. — An diesen Anschauungen ist wohl richtig, daß, wie auch Freudenberg betont, die Frage, ob und inwieweit Ligninpräparate durch Kondensation, Polymerisation usw. gegenüber nativem Lignin verändert sein könnten, stets im Auge zu behalten sein wird und weiter wohl auch, daß in vielen Fällen durch Säureeinwirkung ein „erhöhter Ligningehalt vorgetäuscht worden ist". Im übrigen aber sind wir der Ansicht, daß Storch (1935), Wedekind (1936) und andere Forscher mit ihrer Kritik an den weitgehenden Anschauungen Hilperts Recht haben dürften. Storch führt aus, daß

1. bestimmt nicht das gesamte Buchenholzlignin ein Reaktionsprodukt ist, und daß

[14]) Prototyp ist im Allg. das Fichtenholzlingnin. Ueber Unterschiede zwischen Buchen- und Fichtenlignin s. Anm. auf S. 7.

2. es für den löslichen Anteil des Buchenholzlignins unbewiesen ist, daß es sich nur um ein künstliches Reaktionsprodukt handelt.[15])

Wir halten uns somit am besten an die von Kalb (S. 158) gegebene Definition: „Lignin ist ein aus C, H und O bestehender Stoffkomplex und Zellwandbestandteil, welcher durch hohen Methoxylgehalt (Benedikt und Bamberger 1890), wobei der Methylalkohol ätherartig fest gebunden ist, (also anders, als in den Pektinstoffen), hohen C-Gehalt (62 bis 69% nach Fuchs, 1926), leichte Oxydierbarkeit (Payen 1836), Mangel an Hydrolysierbarkeit, Löslichkeit im Alkali und sauren Sulfiten, und durch bestimmte Farbenreaktionen gekennzeichnet ist."

Die in verholzten Zellwänden vorkommenden Hemizellulosen werden wohl auch als „Kittstoffe" (Freudenberg u. Mitarbeiter 1932) bezeichnet. Mannan sowie schwer- und leichtlösliches Xylan samt der Zellulose werden zum „Skelett", Galaktan und Araban samt Lignin zu den „Inkrusten" verholzter Zellwände gezählt. (Schmidt 1932, nach Kalb, S. 159.)

Zu den „Accessorischen Stoffen", die nicht zu den eigentlichen Baustoffen der verholzten Zellwände gehören, sondern diese nur durchtränken, werden Harze, Wachse, Gerbstoffe, Phlobaphene u. a. m. gerechnet. Es liegt auf der Hand, daß diese und andere Stoffe von großer Bedeutung für die Widerstandskraft verholzter Wände gegen Mikroorganismen sein müssen, da ihnen vielfach antiseptische Eigenschaften zukommen (Molisch, 1932).

Eine weitere auch für den Bakteriologen und Pilzforscher besonders wichtige Frage, welche die Holzchemie seit langer Zeit immer wieder beschäftigt hat und auch heute noch erörtert wird, ist die Frage, ob in den verholzten Zellwänden die Zellulose (bezw. die andern Kohlehydrate und Pektine) mit dem Lignin chemisch verbunden ist, oder nicht. Im ersteren Fall müßten xylophage Mikroorganismen diese Verbindung zunächst, voraussichtlich enzymatisch, lösen, im letzteren aber nicht. Ueber den Stand dieser Frage um 1925 orientiert gut die Darstellung von Wisselingh, 1925. Aus unsern obigen Ausführungen

[15]) Ueber lösliche und unlösliche Lignine s. Kalb, S. 1457. Unlösliche Lignine sind aus verholzten Zellwänden darstellbar durch Polysaccharidlösende Mittel (Säuren, Kupferoxydammoniaklösung); es handelt sich dabei um feste Rückstände mit Zellwandstruktur. — Lösliche Lignine entstehen durch Einwirkung solcher Reagentien, welche Lignin in „peptisierte Derivate" (Alkalilignine, Ligninsulfosäuren), überführen.

geht schon hervor, daß Freudenberg und mit ihm viele andere Forscher, u. a. Lüdtke (1928 (I), 1931), eine chemische Verbindung der beiden Stoffkomplexe leugnen.[16]) Wenn andere Forscher aus der schweren Herauslösbarkeit der Zellulose aus verholzten Lamellen durch Kupferoxydammoniak das Gegenteil geschlossen haben oder noch schließen, so entgegnet Freudenberg, daß in den üblichen Mitteln die Zellulose zwar quillt, daß aber das Lignin ihre Wegdifussion verhindert. Erst bei ganz feiner Verteilung, oder falls die „verkittenden Hemizellulosen" entfernt sind, findet nach dem genannten Forscher Weglösung statt. Man könnte aber auch daran denken ,daß die Zellulose, die ganz vom Lignin eingeschlossen ist, in ihrer Quellbarkeit beeinträchtigt ist. (vgl. Kalb S. 186.) Jedenfalls braucht nach dem heutigen Stande der chemischen Forschung der Mikrobiologe eine chemische Bindung zwischen Zellulose und Lignin in verholzten Zellwänden nicht unbedingt anzunehmen.

Die nunmehr zu schildernden mikrochemischen Untersuchungen wurden mit nicht weiter vorbehandeltem Material von Kirschkernen ausgeführt. Chlorzinkjod: (Rezept bei Arth. Meyer, Bot. Praktik 1915, S. 239.) Die Wände der Fasern und der Steinzellen färben sich in Chlorzinkjod hellgelb. Weiter zeigt sich, daß die Lumina der Fasern mit einer Sanio'schen Knorpelschicht ausgekleidet sind (1860), welche Zellulosereaktion gibt (s. auch Potter, 1904); die Schließhäute der spaltenförmigen Tüpfel an den Fasern geben ebenfalls Zellulosereaktion. Ob auch die Steinzellen, welche, wie oben schon gesagt, weitaus die Hauptmasse des Materials ausmachen, immer mit einem äußerst dünnen auf Chlorzinkjod ansprechenden Häutchen ausgekleidet sind, läßt sich kaum sicher feststellen. Läßt man das Chlorzinkjod längere Zeit einwirken, so färben sich infolge von allmählicher Verquellung die zuerst hellgelben, verholzten Zellwände dunkler und erhalten einen Stich ins Braunviolette. Noch beachtenswerter ist es aber, daß sich an den Schnitträndern, wo das Rasiermesser „quetschend und zerfasernd" gewirkt hat, die Violettfärbung auf Chlorzinkjodzusatz sofort zeigt. Diese Erscheinung, welche schon von Alexandrow u. Mitarbeitern (1927), Lüdtke (1928), Kisser und Lettmayr (1933), Frey-Wißling (1935) und Baker (1937) an verholzten Wänden beobachtet worden ist, wird von denjenigen Forschern, welche die Meinung verfechten, daß Zellulose und Lignin in den Holzlamellen keine chemische Verbindung eingehen, sondern,

[16]) Bei Lüdtke finden sich auch solche Forscher genannt, die den entgegengesetzten Standpunkt vertreten, z. B. Meyer u. Mark, 1928.

daß die Zellulose vom Lignin nur umkrustet ist, neben anderen Gründen als Stütze für ihre Anschauung ins Feld geführt; sie ist also auch bei unserem Material gut zu beobachten.

Es sei dann kurz darauf hingewiesen, daß die Zellwände der Kirschkerne sich mit Ruthenium rot rot färben (mit einem Stich ins Gelbliche). Die Rotfärbung wird bekanntlich als Reaktion auf Pektinstoffe gedeutet.

Bevor ich nun auf den Ausfall der Holzreaktionen zu sprechen komme, seien mir einige Bemerkungen erlaubt zu der Kritik, welche Friesen (1935) und Lüdtke (1928) an diesen bei den Botanikern üblichen Reaktionen, zumal der Wiesner'schen Phlorogluzin-HCl-Reaktion üben:

Gestützt auf die oben erwähnten Untersuchungen von Hilpert und seinen Mitarbeitern übt Friesen (1935) scharfe Kritik an den in der Botanik gebräuchlichen Holzreagentien. Da nach seinen Untersuchungen auch reine Zucker (Laevulose, Saccharose usw.) mit Phlorogluzin Rotfärbung ergeben, sagt er, daß auf Grund dieser Reaktionen keine Schlüsse auf die Natur der verholzenden Stoffe gezogen werden können. „Zucker können mit Säuren Reaktionsprodukte liefern, die mit Lignin große Aehnlichkeit haben." Gleiches soll nach Friesen aber auch für die Reaktion nach Mäule und für die Chlorreaktion gelten, da auch bei diesen Reaktionen die Verharzung etwaiger Zuckerkomponenten der verholzten Wände in Betracht gezogen werden müsse. Dieser Kritik wird sich der Botaniker nicht anschließen können. Friesen führt ein neues Holzreagens ein, Quecksilbersulfid, durch welches die verholzten Zellwände schwarz gefärbt werden. Es dürfte in seiner Anwendung (s. Friesen, S. 90) recht umständlich sein, außerdem fehlt, wie schon von andern Forschern betont worden ist, vorläufig der sichere Nachweis, daß es spezifisch für verholzte Wände ist. Allerdings sagt Friesen, daß unverholzte Zellwände durch sein neues Reagens nicht gefärbt werden. —

Lüdtke (1928, II, S. 34) sagt, daß man scharf unterscheiden müsse zwischen der Reaktion (Rotfärbung) welche mittels alkoholischer Phloroglucinlösung + Salzsäure eintritt und derjenigen Rotfärbung, welche wässerige Phlorogluzinlösung + Salzsäure gibt. Letztere sei die „Ligninreaktion", erstere aber eine Reaktion auf die „Primärlamellensubstanz". Ich habe an meinem Material die Berechtigung dieser Aussage nicht feststellen können. Die Reaktion mit starker alkoholischer Phlorogluzinlösung ist meiner Erfahrung nach empfindlicher, als die mit wässeriger

und sollte immer versucht werden, wenn die Reaktion mit wässeriger Phlorogluzinlösung ausbleibt. Ich bezeichne die Phlorogluzinreaktion immer erst dann als negativ, wenn die Schnitte nach Behandlung mit starker alkoholischer Phlorogluzinlösung und im Anschluß daran mit 10- oder 20%iger HCl behandelt, sich nicht rot färben. —

Ferner habe ich stets darauf geachtet, daß keine Erwärmung der Präparate durch Verwendung zu starker Salzsäure eintritt, weil sonst allerdings die Möglichkeit einer „Verwechslung mit der Phlorogluzinreaktion der Pentosen" nicht ausgeschlossen ist (Kalb, S. 180). Für den Verlauf der Phlorogluzinreaktion ist die Konzentration der verwendeten HCl von großer Bedeutung. Durchtränkte ich Kirschkernsplitter mit wässr. Phlorogluzinlösung, so wurden sie dann in 20 oder 10% HCl alsbald dunkelrot bis rot, in 5%iger HCl nur hellrot. In 2,5% HCl zeigten sie erst nach längerer Zeit eine hellrote Färbung.

Nun kommen wir zu den „Holzreaktionen", wie sie die Kirschkerne geben:

Positiv verläuft sowohl an den Mittellamellen als auch an den Verdickungsschichten, nicht aber an den Schichten, welche, wie eben erwähnt, Zellulosereaktion geben, die Reaktion nach Mäule (1901), nach Casparis (1920); s. auch Zetzsche, (S. 304), die Reaktion mit Anilinsulfat und mit Phloroglu zin, endlich auch die Färbung mit Phenolsalzsäure. Sodann ist auch die „Croß-Bevansche Reaktion", d. h. Gelbfärbung der Holzlamellen bei Einwirkung von Chlor positiv. (s. Kalb, S. 186 ff.) [17]) Beachtenswert ist ferner, daß die verholzten Wandlamellen der Fasern der Innenseite sich mit Phlorogluzin + HCl schwächer, nach Mäule aber stärker, jedenfalls leuchtender rot färben, als die Steinzellenwandungen. Daß die beiden genannten Holzreaktionen nicht immer parallel gehen, ist ja bekannt, und wird gleich noch durch weitere Beispiele belegt werden, in denen darauf hingewiesen werden wird, daß nach bestimmter Behandlung die Phlorogluzinreaktion abgeschwächt, die Mäulesche Reaktion um so leuchtender wird. Schindler (1932) vermutet, daß die Mäule-Reaktion um so kräftiger ausfällt, je größer der Gehalt an Pentosanen, die Phlorogluzinreaktion aber umgekehrt um so schwächer ist, je größer dieser Gehalt ist; ich selbst habe keine Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Vermutung beizubringen.

[17]) Nach Kalb dürfte die Gelbfärbung mit Chlor für die Verholzung „ziemlich charakteristisch" sein. Nach Friesen, 1935, ist die Kenntnis dieser Reaktion auf Payen zurückzuführen.

Wir gehen jetzt dazu über, die Einwirkung von Eau de Javelle zu studieren.[15]) Die Schnitte wurden, nachdem sie in diesem Reagens verweilt hatten, immer erst nach gründlicher Wässerung histochemisch untersucht. Das gilt auch für die andern Reagentien, (Säuren, Laugen usw.), die weiter unten genannt sind.

Wenn die Schnitte ungefähr eine halbe Stunde in Javellescher Lauge verweilt haben, sind zwar alle genannten Holzreaktionen noch positiv, die Phlorogluzinreaktion aber etwas geschwächt, die Chlorreaktion fast ganz verschwunden. Nach 7stündiger Wirkung der Eau de Javelle ist die Phlorogluzinreaktion kaum mehr positiv. Mit Chlorzinkjod färben sich die Wandlamellen nunmehr sofort violett, die Mäulesche und die Casparis-Reaktion sind noch positiv.

Hat die Eau de Javelle etwa 12 Stunden eingewirkt, so ist die Phlorogluzinreaktion verschwunden, die Anilinsulfatreaktion fällt aber eben noch positiv aus; Mäule- und Casparisreaktion sind noch ganz deutlich. Bald kommt dann, je nach der Dicke der Schnitte etwas früher oder später, ein Zeitpunkt, in welchem alle Holzreaktionen versagen; endlich, etwa nach 20 Stunden zerfallen die Schnitte infolge von der Zerstörung der Mittellamelle in die einzelnen Zellen, deren Wände jetzt sehr schöne Zellulosereaktionen geben.

Daß es verholzte Membranen gibt, welche zwar die Mäule- aber nicht die Phlorogluzinreaktion zeigen, daß es ferner durch bestimmte Behandlungsweisen gelingt, zu erreichen, daß diese Reaktion schwindet, jene aber noch erhalten bleibt, ist ja bekannt. Darauf haben Mäule (1901), v. Faber 1904) Siersch, (1926), Lüdtke (1928) hingewiesen und Beispiele dafür namhaft gemacht. Neu ist aber, wenn ich nicht irre, meine Beobachtung, daß die Anilinsulfatreaktion, deren Ergebnisse sich sonst mit der Phlorogluzinreaktion decken, empfindlicher ist, als jene und nach geeigneter Behandlung des Holzes noch erhalten bleiben kann, wenn die Phlorogluzinreaktion schon verschwunden ist. Das gilt wenigstens für den Fall, daß Schnitte untersucht werden, die vor der Einwirkung der Reagentien blendend weiß sind, während bei etwas gelblichen Schnitten, wie sie häufig vorliegen, eine schwache Reaktion mit Anilinsulfat sich leicht der Beobachtung entzieht. Sodann dürfte es beachtenswert sein, daß auf Grund meiner Beobachtungen

[15]) Ich benutzte käufliche Eau de Javelle, die so kräftig war, daß auch Baumwollhaare in ihr nach einiger Zeit in kurze Stücke zerfielen, um dann unter Verquellung eine opalisierende Lösung zu bilden.

die Gelbfärbung des Holzes mit Chlor, eine seitens der Chemiker als typisch angesehene Reaktion an Schnitten, die einem Bleichmittel, wie Javellescher Lauge ausgesetzt werden, schon versagt (u. zw. etwa gleichzeitig mit der Phlorogluzinreaktion), wenn die Holzreaktionen nach Mäule oder nach Casparis noch positiv verlaufen. —

Es ist seit langer Zeit bekannt, (vgl. die verschiedenen Handbücher der botanischen Histochemie), daß auch Behandlung mit Natron- oder Kalilauge die Phlorogluzinreaktion ausschaltet. So findet z. B. Lüdtke (1931), daß die Rotfärbung mittels Phlorogluzin im Holz von Espen, Fichten, ferner in Weizenhalmen durch Behandlung dieser Objekte mit 6% NaOH während 24 Stunden stark geschwächt ist, daß einstündiges Kochen im gleichen Reagens genügt, um sie ganz negativ ausfallen zu lassen; wie sich dann die Mäule-Reaktion verhielt, wird nicht angegeben. Wenn ich mein Kirschkernmaterial eine Stunde lang in 2% KOH aufkochte, so verlor es 12% seines Trockengewichtes, hauptsächlich wohl wegen des Schwundes der „Hemizellulosen", aber alle Holzreaktionen waren dann noch positiv. Kochte ich längere Zeit, so erreichte ich, daß nunmehr die Phlorogluzinreaktion negativ ausfiel, die Reaktion nach Mäule zunächst aber noch positiv war. Die Zellwände färbten sich in Chlorzinkjod braunviolett, die innersten Wandlungen aller Zellen waren blau verquollen, auch hoben sich jetzt die Tüpfelkanäle deutlich dunkelblau hervor. Perhydrol: Wie Siersch (1926) gefunden hat, kann man auch durch Behandlung mit Perhydrol erreichen, daß verholzte Lamellen gegenüber Mäule positiv, gegenüber Phlorogluzin aber negativ reagieren. Ich kann das für mein Material bestätigen. Denn legte ich meine Kirschkernsplitter in Perhydrol, um sie etwa 6 Wochen lang bei Raumtemperatur darin verweilen zu lassen, so färbte sich die Lösung und das Material goldgelb und die Zellwände reagierten nun nicht mehr mit Phlorogluzin und HCl, wohl aber noch mit dem Mäuleschen Reagens. Legte ich Schnitte durch die Splitter nun in Chlorzinkjod, so wurden die Verdickungsschichten in diesem Reagens gelb, die Lumina der Zellen und Tüpfel aber waren mit einer verquollenen, sich violett färbenden Haut ausgekleidet. Das Material in diesem Zustand gab, nebenher bemerkt, auch gute Gelegenheit zum Studium der Mittellamellen. Diese färbten sich in Chlorzinkjod gar nicht, färbten sich aber in Rutheniumrot intensiv, wie übrigens auch die Verdickungsschichten. Jedenfalls sind also durch die Perhydrolbehandlung diejenigen Stoffe der Mittellamellen, welche am

unbehandelten Material mit Phlorogluzin reagieren, entfernt worden, während die Mittellamellen selbst zunächst noch erhalten geblieben sind und die Reaktionen der Pektinstoffe zeigen.

Verdünnte Säuren: Die Behandlung mit verdünnten Säuren nahm ich zunächst in der Absicht vor, mir ein Urteil über den Gehalt der Kirschkernschalen an den in diesem Mittel löslichen Hemizellulosen zu bilden.[19]) Ließ ich während einer Woche 5%ige Schwefelsäure bei Raumtemperatur unter häufigem Umschütteln auf Kirschkernpulver einwirken, so verlor es 7% seines Trockengewichtes. Aber es war auch nach weiteren drei Wochen, während deren es wiederum 6% eingebüßt hatte, der Zeitpunkt, in dem man hätte sagen können, daß alles in verdünnter Säure lösliche nunmehr in Lösung gegangen sei, nicht erreicht. Vielmehr verlor das Material durch die Behandlung mit 5%iger Schwefelsäure auch weiterhin, wenngleich langsam an Gewicht. Eine quantitative Auswertung der genannten Zahlen würde also große Bedenken haben.[20])

Bemerkenswert war aber, daß auch nach langer Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure, wodurch nach Angaben in der Literatur auch aus verholzten Wänden die Hemizellulosen quantitativ in Lösung gehen sollen, die Holzreaktionen und zwar sowohl die nach Mäule als auch die Phlorogluzinreaktion noch ungeschwächt in die Erscheinung traten (so auch Lüdtke, 1928). Es konnten somit, jedenfalls mit dieser Methode, keine Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, daß die genannten Holzreaktionen mit einem Gehalt der verholzten Zellwände an Hemizellulosen (Pentosanen) in Zusammenhang zu bringen sind. —

Kocht man Kirschkernsplitter lange Zeit, nämlich wochenlang, in anderthalbprozentiger Schwefelsäure am Rückflußkühler unter häufiger Erneuerung der Säure, so verfärben sie sich schon sehr bald dunkelschwarzbraun, und die Säure enthält, auch wenn sie häufig gewechselt wird, immer noch reduzierende Stoffe und Proben der Säure, die mit Phlorogluzin und Salzsäure versetzt wurden, zeigten zunächst noch Rotfärbung. Schließlich gibt das Material keine phlorogluzinpositiven Stoffe mehr an die Säure ab, auch wenn es selbst noch deutlich positiv reagiert. Es nimmt

[19]) Haselnußschalen enthalten nach Rubner (1916) in 100 g Trockensubstanz: 38% Zellulose, 30% Pentosane, 32% „Restsubstanzen". R. Bauer (Diss. Techn. Hochsch. Breslau 1936,) findet in Pflaumenkernschalen: Lignin, aus dem Methoxylgehalt geschätzt: 37%, (nach Willstätter 32%) Zellulose: 27%, Pentosan (nach Tollens): 30%.

[20]) Baumwolle, ungereinigt verwendet, verlor in 5%iger Schwefelsäure innerhalb einer Woche bei Raumtemperatur c. 4% ihres Trockengewichtes.

während des Kochversuches stark an Gewicht ab; einen Zeitpunkt, an welchem alles, was in der verdünnten Säure bei Kochtemperatur löslich ist, in Lösung gegangen wäre, konnte ich aber auch so nicht erreichen. Für histochemische Untersuchungen eignet sich das genannte lange Zeit mit Säuren behandelte Material wegen seiner dunklen Färbung kaum. Immerhin konnte so viel ermittelt werden, daß es auch nach recht langer Einwirkung (ca. 1 Woche) der kochenden verd. Säure, nachdem es zur Aufhellung ganz kurze Zeit in eau de Javelle gelegt worden war, mit Phlorogluzin und nach Mäule noch positiv reagierte. Kochte man noch längere Zeit in der verd. Säure, so eignete sich das stark veränderte Material schlechterdings nicht mehr für histochemische Untersuchungen. Es schien mir aber, daß endlich die Holzreaktionen schwächer oder negativ werden.

In Chlorzinkjod untersucht, zeigten sich die innersten Wandlamellen der Zellen nach langer Einwirkung verdünnter Säuren stark verquollen, blau, und die Lumina der Zellen waren mit blauen Massen ausgefüllt. Die äußersten Wandlamellen färbten sich in Chlorinkjod gelb die Tüpfelkanäle blau. Die Mittellamellen waren farblos in Chlorzinkjod.

Nun ist es seit Singer (1882) bekannt, daß Holz an Wasser Stoffe abgibt, welche mit Phlorogluzin und Salzsäure positiv reagieren (vgl. dazu auch Czapek 1899. Potter, 1904. Grafe 1904, Lüdtke 1928. Kalb, S. 178 f). Ich versuchte daher die Kirschkernsplitter oder das Kirschkernpulver mit heißem Wasser zu extrahieren, in der Hoffnung, durch diese verhältnismäßig milde Methode ein Präparat für meine Bakterienversuche zu erhalten, welches zwar noch Verholzung auf Grund der Mäule'schen Reaktion, aber keine Phlorogluzinreaktion mehr gab. Schon nach einer Behandlung mit heißem Wasser während 2 bis 3 Stunden verlieren die Kirschkerne etwa 2% ihres Trockengewichtes. Das Wasser färbt sich dann, mit Phlorogluzin versetzt und mit HCl angesäuert, intensiv rot, ebenfalls das Material. Auch mit Anilinsulfat reagieren dann Wasser und Material positiv (während das Thymolreagens von Molisch versagt). Auch tagelang am Rückflußkühler gekochtes Material gibt immer noch phlorogluzinpositive Stoffe an Wasser ab, auch wenn das Wasser noch so oft erneuert wird und das Material selbst reagiert mit Phlorogluzin auch nach Tagen noch scheinbar eben so stark, wie vor der Extraktion mit Wasser. Dampft man das Wasser scharf ein, so findet man, daß es zwar schwach aber deutlich Fehlingsche Lösung reduziert. Es wurde auch noch ein Dauerversuch angesetzt, in welchem Kirschkernpulver wochenlang am Rückflußkühler in dest. Wasser ausgekocht

wurde. Das Wasser wurde auch in diesem Versuch häufig gewechselt. Aber auch in diesem Versuch reagierte das Wasser dauernd positiv mit Phlorogluzin, allerdings schließlich nur noch schwach, etwas stärker mit Anilinsulfat, aber die Pulverteilchen zeigten immer noch die Holzreaktionen außerordentlich deutlich. Bei mikroskopischer Betrachtung ergab sich, daß die Zellwände sich mit Chlorzinkjod gelb färbten, in einigen Zellen zeigte sich eine innere Wandschicht violettbraun gefärbt, ebenso die Tüpfelkanäle. Das Endergebnis war also, daß es mir eben so wenig, wie meinen Vorgängern auf diesem Gebiete gelingen wollte, die Phlorogluzin- bezw. Anilinsulfat-positiven Stoffe mittels kochenden Wassers aus den Zellwänden auszuziehen. —

Ganz ähnliche Ergebnisse hatten meine Versuche, in denen Kirschkernmaterial mit Alkohol ausgekocht wurde (s. dazu Czapek 1899 und die andere oben zitierte Literatur). Der Alkohol färbt sich bald gelb, wenn man Kirschkernsplitter oder -Pulver darin auskocht und schon nach einer Kochdauer von wenigen Minuten wird er auf Phlorogluzin-HCl-Zusatz intensiv rot. Die Splitter selbst verlieren innerhalb von zwei Stunden ca. 2% ihres Trockengewichtes, und zeigen die Phlorogluzinreaktion unvermindert stark. Ein lange währender Dauerversuch, während dessen tags über immer am Rückflußkühler gekocht wurde, ergab, daß nach 14 Tagen der Alkohol, der auch in diesem Versuch immer wieder erneuert worden war, endlich auf Phlorogluzinzusatz nur noch schwach positiv mit Rotfärbung reagierte, die Splitter oder das Pulver selbst aber färbten sich nach wie vor stark rot auf Phlorogluzinzugabe. Dampfte ich den Alkohol ein, mittels dessen ich das Material ausgezogen hatte, so blieb ein geringfügiger, brauner Rückstand, der mit Phlorogluzin positiv reagierte. (So auch Czapek.) Daß bei den eben genannten Versuchen, in denen die Kirschkerne mit Wasser oder mit Alkohol extrahiert worden waren, die Rotfärbung auf Phlorogluzin-HCl-Zusatz wirklich den verholzten Wänden zu verdanken war, zeigte mir ein vergleichender Versuch mit nicht verholztem Pflanzenmaterial. Denn zog ich z. B. Helianthusmark, das nicht verholzt ist, oder Baumwolle mit heißem Wasser oder Alkohol aus, so ergab das Extraktionsmittel keine positive Phlorogluzinreaktion, wohl aber, wenn ich Hollundermark, das bekanntlich verholzt ist, mit Wasser oder Alkohol extrahierte. — Jedenfalls gelang es mir auch mittels Alkoholextraktion nicht, aus dem Kirschkernmaterial die phlorogluzinpositiven Stoffe, das sog. „Hadromal" zu entfernen. [21]) —

[21]) Ueber Lösung von Ligninanteilen durch Alkohol bei Gegenwart von Mineralsäuren s. Freudenberg und Mitarb., 1935, S. 62.

Eine für den Biologen ganz besonders wichtige Frage ist die nach dem Maße der Verholzung seines Pflanzenmaterials; denn es ist nicht nur wahrscheinlich, sondern fast sicher, daß stark verholzte Wände der Zellen von Mikroorganismen viel schwerer angegriffen werden können, als schwach verholzte. Ein Maß für die Verholzung ergibt das Verhältnis zwischen Lignin, d. h. oxydablen Anteilen und Polysachariden, d. h. hydrolysierbaren Anteilen. Ich stellte nun zunächst trotz der gegen die Verwendung starker Säuren geäußerten Bedenken (s. oben Hilpert) folgende Versuche, i. W. nach der Methode von Bamford and Campbell (1936) an: 0,6 g Kirschkernpulver wurde mit 10 Cc. 72%iger Schwefelsäure übergossen; das Material färbte sich sofort dunkel, fast schwarz und blieb bei Raumtemperatur zwei Stunden lang in der Säure stehen. Sodann wurden 200 Cc Wasser dazu gegeben, sodaß das Pulver nunmehr in einer Säure von 4% sich befand.[22]) Jetzt wurde mehrere Stunden im Wasserbad erhitzt, dann filtriert, ausgewaschen und getrocknet. Es waren 64% des Materials in Lösung gegangen, 36% zurückgeblieben. Diese 36% waren als „Lignin" zu bewerten.[23]) Um an diesem dunkel gefärbten „Lignin" histochemische Reaktionen anstellen zu können, wurde es sehr kurze Zeit in eau de Javelle gebleicht bis es hellgelb war. Es war nun Mäule-negativ, Phlorogluzin-negativ, zeigte auch keine Zellulosereaktion. Ließ man es einige Zeit in eau de Javelle liegen, so zerfloß es bis auf geringfügige Reste. —

Nach Wedekind (1936) bestehen 25 bis 33% der gesamten Holzmasse aus Lignin. Lüers (1936) gibt an, daß bei der Holzverzuckerung nach dem Scholler-Tornesch-Verfahren Nadelholz etwa 30 bis 33% Lignin, Laubholz nur 20 bis 25% Lignin als Restprodukt gibt.[23]) Unser Kirschkernmaterial zeigt also im Vergleich zu andern Hölzern keinen ganz besonders hohen Ligningehalt. Fraglich ist mir freilich, ob und inwieweit auch das Lignin durch die Säurebehandlung angegriffen wird. Nach Angaben in der Literatur möchte ich einen solchen Angriff für durchaus möglich halten. —

---

[22]) Bamford and Campbell führen aus, daß dann, wenn zuerst die Hydrolyse mit schwachen und sodann mit starken Säuren erfolgt, die Bildung von Kochlehydratkondensationsprodukten nur dann verhindert werden kann, wenn die Produkte der Hydrolyse sofort entfernt werden.

[23]) Wenn man die „Restsubstanz" die Rubner (1916) in den Haselnußschalen findet, als die „Ligninkomponente" betrachtet, so beträgt der Ligningehalt dieser Schalen 32%. — Bauer (s. Anm. auf S. 28) findet in Pflaumenkernschalen 32% Lignin (nach Willstätter), 37% auf Grund des OCH_3-gehaltes.

Verwendet man bei diesen Versuchen statt des Pulvers Kirschkernsplitter, so wird man die Erfahrung machen, daß diese in der starken Säure nur äußerlich schwarz werden, im Innern auf dem Bruch aber weiß bleiben und noch viel Zellulose enthalten.

Von dem klassischen Verfahren der Mazeration des Materials mit Kaliumchlorat und Salpetersäure[24]) war eine scharfe, quantitative Trennung von Lignin und Zellulose samt andern Kohlehydraten von vorne herein nicht zu erwarten, denn wenn dieses Mittel auch zunächst die Lignine wegoxydiert, so wirkt es doch auch zugleich hydrolysierend, läßt also selbst bei vorsichtiger Anwendung d. h. bei Vermeidung von Erhitzung, die Zellulose, – die übrigens auch oxydativ angegriffen werden dürfte, keineswegs intakt. Mazerierte ich Kirschkernsplitter oder Pulver mit einer 16%igen Salpetersäure in halb gesättigter Kaliumchloratlösung bei Raumtemperatur, so fand ich, daß nach dreitägiger Versuchsdauer etwa die Hälfte des Trockengewichtes verloren geht. Der Rückstand ist dann aber noch keineswegs ganz weiß, sondern noch deutlich gelb. Setzt man den Versuch noch längere Zeit, etwa 2 bis 3 Wochen lang fort, so findet man, daß höchstens noch etwa 20 bis 30% des Trockengewichtes übrig bleiben, der Rückstand ist dann blendend weiß. Das erstgenannte Ergebnis würde also auf einen Ligningehalt von ca. 50%, das letztere aber auf einen solchen von ca. 65% schließen lassen, unter der falschen Voraussetzung freilich, daß die Kohlehydrate dabei ganz unberührt geblieben, seien. Irgendwelche sicheren Ergebnisse, die eine quantitative Auswertung gestatten, würde man zweifellos nur bei einer ganz systematischen Weiterführung solcher Versuche erzielen.[25]) Ich ziehe jedenfalls vor, ganz davon abzusehen, um so mehr, als die vorher geschilderte, allerdings auch mit Fehlerquellen belastete Säuremethode einen viel geringeren Verholzungsgrad der Kirschkernschalen (36%) ergibt. —

Um die undurchsichtige und unliebsame Wirkung starker Säuren bei den Versuchen, Lignin und Zellulose zu trennen, zu

[24]) Schulze, 1857; vgl. zur Kritik der Methode u. a. Rahn (1933); Norman (1935, I).

[25]) Mazerierte ich nach Schulze Baumwollhaare, so verloren sie 9% des Trockengewichtes.

verhindern, wurde von Chemikern, vgl. besonders Freudenberg und Mitarbeiter, 1935, der Versuch mit gutem Erfolg gemacht, mittels Kupferoxydammoniaks die Zellulose aus dem Holz herauszulösen, um so nach vorheriger Entfernung anderer in Kupferoxydammoniak unlöslicher Kohlenhydrate ein reines Lignin zu erhalten. Auch ich selbst behandelte meine Kirschkernsplitter und Kirschkernpulver mit Kupferoxydammoniak, welches, regelrecht hergestellt, vor der Verwendung immer in seiner Wirkung auf Baumwolle geprüft und während der oft lange dauernden Versuche häufig gewechselt wurde. Mein Material färbte sich in dem Kupferoxydammoniak alsbald dunkel und es gelang, eine größere Menge Zellulose herauszulösen, was an dem Gewichtsverlust ohne weiteres festgestellt werden konnte. Aber es gelang mir nicht zu erreichen, daß der Rückstand nun wirklich zellulosefrei war, denn immer blieb, falls er mit eau de Javelle oder mit Schulzeschem Gemisch behandelt wurde, ein weißer, gar nicht unbeträchtlicher Rückstand, der die Zellulosereaktionen zeigte, übrig. Auch nach vielwöchiger Behandlung war immer noch Zellulose im Rückstand nachzuweisen. Es liegt mir fern zu leugnen, daß bei viel feinerer Zerteilung des Materials (s. Lüdtke, 1931) ein zellulosefreies Präparat zu erhalten sei. Freudenberg u. Mitarbeiter (1935) hatten bekanntlich ein komplizierteres Verfahren angewendet, indem sie Holz (Fichtenholz) abwechselnd mit verdünnter Säure und Kupferoxydammoniak extrahierten. Ich möchte daher noch erwähnen, daß auch ich den Versuch machte, meine Kirschkernschalen erst lange Zeit mit verdünnter Säure (5% H_2SO_4) und dann erst mit Kupferoxydammoniak zu behandeln; aber auch so gelang es mir nicht, die Zellulose quantitativ zu entfernen, trotz sehr langer Versuchsdauer. Ich kann also auch auf Grund der Kupferoxydammoniakmethode keine exakten, quantitativen Angaben über das Verhältnis: Lignin / Nicht-Lignin in den Kirschkernschalen machen.[26])

In histochemischer Beziehung sei noch hinzugefügt, daß Kirschkernschalenschnitte, die drei Tage in Kupferoxydammoniak gelegen hatten, und dann mit Ammoniak, Wasser, verd. Säure und abermals Wasser gründlich ausgewaschen worden waren, bräunlich aussahen, sich mit Phlorogluzin-HCl deutlich, aber doch etwas schwach färbten, bei der Behandlung nach Mäule schön leuchtend rot wurden. Die Zellwände färbten sich in Chlorzinkjod gelb, aber die Zellen enthielten im Innern blaue.

[26]) Ungar (1916) sagt, daß durch Kupferoxydammoniak auch „Lignin-stoffe" in Lösung gehen.

klumpige Massen. Es lag also hier offenbar das dem Botaniker bekannte „Gilson-Phaenomen" vor. (s. z. B. Tunmann-Rosenthaler, 1931, S. 902).

Im Anschluß an diese Kupferoxydammoniakversuche sei noch die Frage erörtert, wie denn reines Ammoniak auf verholzte Zellwandlamellen wirkt. Ich finde darüber in der Literatur verschiedene Angaben. Nach Lüdtke (1931) wird mit NH_3 behandeltes verholztes Material phlorogluzinnegativ, d. h. Ammoniak wirkt ähnlich wie Natron- oder Kalilauge, nach Ungar aber (1916, S. 88) findet durch Einwirkung von Ammoniak keine Veränderung der Holzreaktionen statt. Er sagt, daß die Phlorogluzinreaktion nach Aufenthalt des Materials in 25% Ammoniak während 20 Stunden noch unvermindert gelingt. 12 Gramm Holz hatten während dieser Zeit nur 0,6 g verloren. Ich selbst kann für meine Kirschkernschalen die Angaben von Lüdtke bestätigen. Legte ich Splitter oder Pulver von Kirschkernen in verschieden starkes Ammoniak, (5% bis 35%) so wurde dieses Material, allerdings erst nach längerer Zeit, phlorogluzinnegativ, die Fähigkeit, die Mäule-Reaktion zu geben, blieb aber zunächst erhalten. Ob nach langer Zeit das Material auch Mäulenegativ wird, habe ich bis jetzt noch nicht ermittelt. Das Gewicht von Kirschkernpulver nahm in Ammoniak um ca. 10% nach 10 Tagen ab, einer Zeit innerhalb deren die Fähigkeit mit Phlorogluzin zu reagieren dem Material noch nicht verloren gegangen war. Baumwolle in 35% NH_3 gelegt, verlor in dieser Zeit ca. 1,5% des Trockengewichtes.

Ich habe den Eindruck gewonnen, daß die Wirkung des reinen Ammoniaks auf ligninhaltige Zellwände künftig etwas mehr berücksichtigt werden sollte, besonders bei Versuchen, in denen Kupferoxydammoniakwirkung untersucht wird, als es bisher geschehen ist. Uebrigens ist auch bei andern verholzten Objekten solche Ammoniakwirkung unschwer zu beobachten. Ich empfehle z. B. zum näheren Studium Schnitte durch Hollundermark. Nach einem Aufenthalt solcher Schnitte in 35% Ammoniak fällt schon nach 2 Tagen die Phlorogluzin-Reaktion fast negativ aus, einige Tage später aber ist sie vollkommen negativ geworden. Die Caspari'sche Reaktion fällt dann noch positiv aus und ebenfalls die Reaktion von Mäule, die ein leuchtendes Rot ergibt. An Kirschkernschnitten schwindet die Befähigung zur positiven Phlorogluzinreaktion etwas später als an Hollundermarkschnitten. [27])

[27]) Die Methode des Aufschlusses verholzter Zellwände mittels Chlordioxyds (Schmidt u. Mitarb. 1921 und 1931, Zit. b. Kalb, S. 158), sowie die Dioxanmethode von Wedekind (1935), habe ich auf die Kirschkernschalen nicht angewendet. —

Es sei zum Schluß noch kurz erwähnt, daß auch untersucht wurde, ob man mittels Ferrichloridlösung in den Schalen der Kirschkerne Gerbstoffe nachweisen kann, die antiseptische Wirkung hätten entfalten können. (Molisch, 1932). Alle einschlägigen Versuche verliefen negativ. Trotzdem kam, wie später noch gesagt werden wird, auch Kirschkernmaterial bei meinen Versuchen zur Verwendung, das lange Zeit mit Acetonwasser, z. B. 40%igem, behandelt worden war, einem Mittel, welches Huber (1929) mit Erfolg verwendet hat, um Gerbstoffe zu entfernen. — Uebrigens dürfte ein großer Teil etwaiger Gerbstoffe zusammen mit anderen Bestandteilen auch durch andere von mir verwendete Mittel, z. B. Natronlauge, (s. oben) in Lösung gegangen sein.

III. Ernährungsversuche.

Ich komme jetzt zu der Besprechung meiner Versuche, Bakterien in Nährlösungen zu züchten, welche lediglich die in verholzten Zellmembranen vereinigten Substanzen in ihrer Gesamtheit oder zum Teil als Quellen zur Deckung des Kohlenstoffbedarfs enthielten.

Wie aus den im vorigen Abschnitte dieses Aufsatzes geschilderten histochemischen Untersuchungen hervorgeht, standen für solche Ernährungsversuche zur Verfügung:

1. Kirschkernschalen, die nicht besonders vorbehandelt worden waren.
2. Kirschkernschalen, welche lange Zeit und möglichst erschöpfend mit heißem Wasser, Alkohol, Azetonwasser extrahiert worden waren. Sie zeigten noch alle Holzreaktionen.
3. Kirschkernschalen, welche so lange mit Laugen, Perhydrol usw. extrahiert worden waren, daß sie die Reaktionen mit Phlorogluzin-HCl und mit Anilinsulfat nicht mehr zeigten, wohl aber die Reaktionen nach Mäule und nach Casparis.
4. Kirschkernschalen, welche so lange mit Schulzes Gemisch mazeriert worden waren, daß ihr Rückstand, der im Gegensatz zu dem gelblich-braun gefärbten Material, das unter 1) bis 3) genannt ist, weiß aussah, die Holzreaktionen vermissen ließ und Zellulosereaktionen ergab.

Die Nährlösungen enthielten, wie das schon für die histochemischen Versuche angeführt worden ist, die Schalen entweder in der Form von groben Splittern, oder als Pulver (s. S. 19).

In einigen Versuchen, die im Anschluß an die Kirschkernschalenversuche ausgeführt wurden, diente auch anderes Holz, bezw. andere verholzte Zellwände, (Zeitungspapier, Sägespäne) als C-quelle. Auch wurden Versuche mit Holzextrakten angestellt. —

Bei den ersten von mir angesetzten Versuchen enthielt die Nährlösung Kirschkernpulver oder Kirschkernsplitter, die nicht besonders vorbehandelt worden waren. Im übrigen hatte sie die folgende Zusammensetzung:

Leitungswasser: 1000Cc.
$MgSO_4 + 7\ H_2O$: 0,24 g.
K_2HPO_4 : 0,6 g.
NaCl : 0,12 g.

Außerdem als Stickstoffquelle entweder $NaNO_3$, 0.5 g, oder $(NH_4)_2SO_4$, 0,6 g. Gelegentlich wurde auch Harnstoff zur Deckung des Stickstoffbedarfes verwendet. In vielen Fällen wurden auch noch Calciumsalze zugegeben. Der pH wurde kolorimetrisch auf 5,5, 6,5 oder 7,5 eingestellt. Nicht selten wurden Kirschkernsplitter oder Pulver in so großer Menge zugegeben, daß sie nicht vollständig von der Nährsalz-Lösung bedeckt waren.

Im Allgemeinen dienten Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Glas als Kulturgefäße. Als Impfmaterial benutzte ich die verschiedensten Bodenproben, Gartenerde, Komposterde, Mischungen dieser beiden, auch Schlammproben. Da für viele Fälle bekannt ist, daß bald kleine, bald größere Impfmengen günstiger wirken (vgl. dazu L ö h n i s' Hdb. d. Bakteriologie, 1935, Bd. 2, S. 486), impfte ich die Kölbchen sehr verschieden stark. Die meisten Kulturen wurden im Thermostaten bei 30 Grad aufbewahrt, andere bei Raumtemperatur, Versuche bei höheren Temperaturen als ca. 30 Grad habe ich nicht durchgeführt.

Neben aeroben Kulturen wurden auch anaerobe angesetzt. Bei diesen standen die Kölbchen in einem Exsikkator, der mittels der Wasserstrahlpumpe evakuiert worden war und an dessen Boden sich Kalilauge und Pyrogallol befanden, die erst nachdem die Evakuierung erfolgt war, durch vorsichtiges Neigen des Exsikkators gemischt wurden. —

Als Ergebnis dieser Versuche, die wochenlang dauerten, kann kurz gesagt werden, daß sich niemals eine auch nur irgendwie lebhafte Bakterienentwicklung bemerkbar machte. Das Holzpulver wurde oft stark von Pilzhyphen umwuchert, auch zeigten sich natürlich einzelne Bakterien, z. B. Kokken, die sich aber zweifellos auf Kosten des organischen Materials entwickelt hatten, das bei starker Impfung in die Kulturkolben mit hineingelangt war, vielleicht auch auf Kosten der geringen Menge nicht inkrustrierter Kohlehydrate, die sich in den Kirschkernschalen mit Hilfe des Mikroskops nachweisen lassen (s. S. 23). Vielfach wurden Bakterien, die sich in den Kulturkolben nach einiger Zeit einfanden, auf Agarplatten in Reinkultur gezüchtet, zeigten dann aber, wenn sie in Nährlösungen übertragen wurden, die lediglich Holz als Kohlenstoffquelle enthielten, keine Entwicklung; wohl aber wuchsen sie, wenn andere C-quellen zu den Nährlösungen zugegeben wurden.

Es wurden dann solche Versuche noch in mannigfachster Weise abgeändert, z. B. derart, daß noch größere Eisenmengen, als sie im Leitungswasser vorhanden waren, in der Form von Ferrophosphat zugesetzt wurden. In noch anderen Versuchen gelangten auch Kirschkernschalen, die mit Azetonwasser extrahiert worden waren, zur Verwendung, aber alle diese Maßnahmen blieben ohne jeden Erfolg.

Um sicher zu gehen, daß trotz der Verwendung von Leitungswasser (an Stelle von destill. Wasser) keine anorganischen Stoffe, die in geringer Menge für die Entwicklung hätten nützlich oder notwendig sein können, sog. „Spurenelemente", in den Nährlösungen fehlten, wurde dann weiter so vorgegangen, daß Hoaglandsche A-Z-Lösung zugesetzt wurde (s. Hoagland 1932). Zu einem Liter der Grundnährlösung wurde je 1 Cc. dieser Zusatznährlösung hinzugefügt. (s. Schropp und Scharrer, 1933). Sodann wurden auch Versuche unter Zugabe von „Bios", das ich mir nach dem Verfahren von Wassink (1934; s. u. A. auch Burgeff 1934) aus Hefe dargestellt hatte, durchgeführt, in wieder anderen Versuchsreihen wurden die Nährsalze im Harn statt in Wasser gelöst, und die Lösung dann mit Holz beschickt. Ferner wurden die Grenzen des in den Lösungen vorhandenen pH's gegenüber den ersten Versuchen noch erweitert, der pH belief sich auf 4,5, 7,5 oder 8,5. Auch wurde verschiedenartiges Kirschkernmaterial benutzt, so außer nicht vorbehandeltem und solchem, das mit Alkohol, Azeton oder kochendem Wasser ausgezogen worden war, auch dasjenige, welches, nach einer der oben genannten Methoden behan-

delt, die Phlorogluzin- und Anilinsulfatreaktion nicht mehr zeigte, sondern nur noch mit dem Mäule- oder dem Caspari's-reagens positiv reagierte. Aber auch in allen diesen Kulturen entwickelten sich nur Pilze einigermaßen kräftig, Bakterien nur dann, wenn mazeriertes Holz, das Zellulosereaktion zeigte, zur Anwendung kam. Es verliefen also auch alle diese Kulturen negativ. —

Um nun noch etwas natürlichere Bedingungen für die Bakterien zu schaffen, wurden weitere Versuchsreihen mit Bodenextrakten hergestellt. Ein kg Gartenerde wurde in einem Liter Wasser erwärmt; dann wurde filtriert, das Filtrat mit Nährsalzen und Kirschkernschalen versetzt und nach dem Sterilisieren beimpft. Die mineralische Grundnährlösung war der in den oben beschriebenen Versuchen ähnlich, enthielt aber außerdem noch Zinksulfat in geringer (0,001%) Menge. Die zur Beimpfung der Kölbchen verwendete Erde entstammte verschiedenen Tiefen. Die Kulturen wurden teils bei Sauerstoffzutritt, teils auch bei Luftausschluß gehalten. Auch hier fand nur zuerst eine geringfügige Bakterienentwicklung statt, und zwar auf Kosten der organischen Stoffe des Impfmaterials und des Bodenextraktes; denn auch in Vergleichskulturen, denen keine Holzsubstanz als Kohlenstoffquelle beigegeben worden war, zeigte sich dieselbe geringfügige Entwicklung von Bakterien. —

Wie schon gesagt, währte die Dauer der geschilderten Versuche mehrere Wochen. Denkt man aber an die außerordentlich langen Zeiträume, die in natura vielfach dazu notwendig sind, damit Holz durch Mikroorganismen vollständig zersetzt wird, so mag man glauben, daß die Dauer der Kulturversuche immer noch viel zu kurz war. Es wurden daher einige dieser Kulturen länger als ein halbes Jahr beobachtet. Ob ich aber mit Gartenerde, Kompost- oder Walderde, Teichschlamm oder Torfmull impfte, immer blieb auch bei solchen Dauerkulturen der Erfolg aus.

Es sei noch erwähnt, daß in einigen Versuchsreihen auch Schwefelsäurelignin als Kohlenstoffquelle zur Verwendung kam; aber auch in solchen Kulturen zeigte sich kein nennenswertes Bakterienwachstum. —

Zusammenfassend sei noch betont, daß in allen Versuchen das Kirschkernmaterial vor dem Beginn und nach dem Abschluß der Versuche auch histochemisch untersucht wurde, um etwaige, während des Versuchs durch Mikrobentätigkeit bewirkte Veränderungen chemischer Natur an ihm zu ermitteln. Solche Aen-

derungen konnten aber nicht festgestellt werden, es sei denn, daß es sich um solche Kulturen handelte, in denen Pilzhyphen in großer Menge die Holzteilchen umwucherten.

Es wurden nun noch anderweitige Versuche angesetzt nach einer Methode, die ich kurz als „Agarplattenmethode" bezeichnen will. Es wurden nährsalzhaltige Agarplatten, mit oder ohne Bodenextrakt hergerichtet und mit verwesenden Holzstückchen oder mit Erdboden, der viel vermoderndes Holz enthielt, oder auch mit Kirschkernen, die im Garten unter Kirschbäumen aufgelesen worden waren, und, wie ihre mürbe Konsistenz ergab, dort schon lange Zeit gelegen haben mochten, reichlich beimpft. Bei mikroskopischer Betrachtung ergab sich, daß diese Kirschkerne zwar teilweise stark korrodierte Sklerenchymzellen aufwiesen, auch von Pilzhyphen umwuchert waren, aber noch alle Holzreaktionen gaben.

Auf solchen und andern, ähnlich hergestellten Agarplatten kamen aber fast immer nur Pilze in der Nähe der Holzstückchen zur Entwicklung. Vereinzelte Bakterien, die dort gediehen, wurden rein gezüchtet, konnten aber bei weiterem Ueberimpfen in holzhaltige Nährlösungen nicht auf Kosten der Holzsubstanz gedeihen. —

Nachdem nun alle die genannten Kulturversuche negative Ergebnisse gehabt hatten, ging ich dazu über, die Versuche von Potter und von Malencovic, die in der Einleitung schon genannt sind, fortzuführen. Es sollte versucht werden, Bakterien zu finden, die solche Kohlenstoffverbindungen verwerten können, die bei der chemischen Analyse oder als Spaltungsprodukte bei dem Abbau verholzter Zellwände durch Pilze entstehen, oder auch schon beim bloßen Ausziehen des Holzes mittels Alkohols oder Wasser gewonnen werden können. Mein Gedankengang dabei war der, daß Bakterien, welche derartige Stoffe als Nährstoffe auszunutzen verstehen, vielleicht auch unzersetzte Holzzellwände angreifen können. —

Von den vielen derartigen Stoffen, auf die man bei einer Durchsicht der Literatur stößt, und die je nach der vorliegenden Holzart verschieden sind, wählte ich aus: Vanillin (das Oxydationsprodukt des Koniferylalkohols), Guajakol und Brenzkatechin (vgl. u. a. Molisch, 1932, Freudenberg und Dürr 1932, S. 127, dort weitere Literatur). Setzte ich nun Nährsalzlösungen oder Bodenextrakte mit Brenzkatechin als Kohlenstoffquelle an, so konnte ich nach Beimpfung mit Erdboden niemals Bakterienwachstum erzielen. Auch wenn ich nur 0,005% Brenzkatechin darbot, unterblieb Bakterienentwicklung.

Wohl aber gelang es mir, Bakterien zur Entwicklung zu bringen, wenn ich Guajakol oder Vanillin als C-quelle verwendete. Solche Bakterien, kurz Guajakol- bezw. Vanillinbakterien genannt, gediehen, wenn ich außer den genannten organischen Verbindungen nur Nährsalze (Nitrat als N-quelle) verwendete. Besser war aber das Wachstum bei Peptongegenwart.

Das Guajakolbakterium zeigte eine gewisse Aehnlichkeit mit den von Gray and Thornton (1928) in ihrer Arbeit über Bakterien, welche aromatische Verbindungen verwerten, beschriebenen Mykobakterien, welche Phenol, Kresol, Naphtalin zersetzen können. Es zeigte den von den genannten Forschern z. B. für ihr Mycobacterium agreste geschilderten Zerfall in Kokken, der in älteren Kulturen zu beobachten war; Verzweigungen der Stäbchen waren nur ganz selten zu finden. Die Neigung zu Involutionsformen in den guajakolhaltigen Lösungen war unverkennbar. In ernährungsphysiologischer Hinsicht sei noch hinzugefügt, daß das von mir gezüchtete Vanillinbakterium von höheren Phenolen nur Vanillin, aber kein Guajakol, das Guajakolbakterium außer Guajakol auch Phenol, aber kein Vanillin, angreifen konnte. Das nach den Angaben von Gray and Thornton von mir rein gezüchtete Phenol-Mycobacterium konnte aber weder Vanillin noch auch Guajakol verwerten. —

Wurden nun Nährlösungen, welche Kirschkernschalen als Kohlenstoffquelle führten mit dem Vanillin- oder dem Guajakolbakterium beimpft, so zeigte es sich, daß keiner dieser beiden Spaltpilze das Holz als Nährstoff verwenden konnte. Wohl aber konnten die beiden genannten Formen gedeihen, wenn ihnen der Rückstand des alkoholischen Auszugs aus Kirschkernschalen (s. S. 30) dargeboten wurde. Das Vanillinbakterium dürfte hierbei i. W. auf Kosten des in diesem Rückstand vorhandenen Vanillins gelebt haben,[25]) das Guajakolbakterium, welches Vanillin nicht verwerten kann, aber auf Kosten anderer nicht genau praecisierbarer Stoffe des Extraktes. —

Es sei nebenher noch erwähnt, daß das „Vanillinbakterium" auch nicht dazu im Stande war, die ligninhaltigen Mittellamellen zwischen den Bastfasern des Flachses aufzulösen. -

Nachdem es mir mit der bisher geschilderten Methodik nicht gelungen war, zum Ziele zu gelangen, ging ich noch dazu über, andere Methoden und auch anderes verholztes Material zu ver-

[25]) Ueber Vanillinzersetzung durch Bodenbakterien berichten Robbins and Lathrop, 1919 (s. Science, vol. 11, p. 894), vgl. auch Waksman, 1936, p. 138.

wenden. Ich griff zunächst nach der Methode von Christensen (1907). Diese besteht bekanntlich darin, daß man Gefäße mit Erdboden anfüllt und auf dessen Oberfläche kleine Stückchen des von Mikroorganismen zu zerstörenden Stoffes legt. Ich benutzte mittelgroße Glasschalen, die mit verschiedenen Böden gefüllt und bei Zimmertemperatur aufgestellt wurden. Sie wurden mit Glasglocken bedeckt, die auf ihrer Innenseite mit feuchtem Fließpapier ausgekleidet waren. Auch wurde der Boden selbst stets feucht gehalten, wobei ein Uebermaß von Feuchtigkeit sorgfältig vermieden wurde (s. dazu Feher, 1933 und Janke u. Mitarb., 1934). Als Versuchsmaterial diente Zellulose, diese nur zum Vergleich, in Form von Filtrierpapier, sodann Zeitungspapier, welches, wie die mikroskopische Untersuchung zeigte, zum größten Teil aus verholzten Fasern bestand, zwischen denen nur vereinzelte Fasern lagen, welche die Zellulosereaktion zeigten, Hobelspäne aus Pappel- oder Fichtenholz, endlich auch Querschnitte durch Kürbisstengel.

Nach einiger Zeit zeigten die Filtrierpapierstückchen das übliche, in der Literatur häufig beschriebene Bild, das auf die Zersetzung durch Zellulosebakterien hinwies. Auch die Zeitungspapierstückchen waren mit Mikroben besetzt, großenteils waren es Pilzhyphen, die mit Bakterien untermischt waren. Aus diesem Mikroorganismenchaos einzelne Bakterien, die Holz hätten zersetzen können, herauszuzüchten, ist mir nicht gelungen. Die übrigen genannten Holzspäne wurden unter Verfärbung ins Bräunliche oder Schwärzliche von Pilzen angegriffen. An den Kürbisstengelquerschnitten war bald die gesamte Wandsubstanz verschwunden bis auf die Kutikula und die verholzten Elemente des sklerenchymatischen Rings und der Leitbündel; diese zeigten noch die Holzreaktionen.

In andern ähnlichen Versuchen wurden Streifen von Zeitungspapier, und Späne von Kiefern- und Pappelholz, die etwa 40 Cm. lang und fingerbreit waren, senkrecht im Erdboden derart angebracht, daß das eine Ende eben über die Oberfläche hinausragte. So fanden sich die verschiedenen Zonen dieser Streifen an Orten mit verschiedener Sauerstoffspannung; wenn dafür Sorge getragen war, daß sie zwischen Glaswandung und Erdboden entlang liefen, so konnte ihre allmähliche Zersetzung auch makroskopisch beobachtet werden, bevor zur mikroskopischen Untersuchung geschritten wurde. In weiteren Versuchen wurden auch dünne Holzbrettchen aus Birken-, Birnbaum- und Kiefernholz verwendet, die in humusreiche Gartenerde gesteckt und in dieser in das Gewächshaus gebracht wurden, wo sie während

7 Monaten stehen blieben. Das Kiefernholz wurde im Laufe der Zeit am stärksten von Pilzen angegriffen, und zwar fand in etwa 10 bis 20 cm Tiefe die Zersetzung am lebhaftesten statt. Die von den Pilzen am stärksten befallenen Stellen waren hier infolge dieses Befalles violett, gelblich-grün, auch dunkel-schwarz verfärbt. Es wurde versucht, aus solchen Stellen auch Bakterien herauszuzüchten, die ev. Holz angreifen konnten. Aber alle dahin zielenden Versuche sind mißlungen.

Schließlich sei noch kurz erwähnt, daß ich auch eine etwas andere, der Cholodny'schen ähnliche Methode (1934) angewendet habe, allerdings ebenfalls ganz ohne Erfolg. Feingesiebte Erde kam in Form eines kleinen viereckigen Hügels auf einen Objektträger, derart, daß die Mitte des Vierecks von Erde frei blieb. Ein Deckgläschen bedeckte den freien, von Erde umgebenen Luftraum und feine Streifchen von Zeitungspapier oder von Holz ragten unter dem Deckgläschen in die Mitte des kleinen Raums hinein, sodaß das Material auch direkt mikroskopisch beobachtet werden konnte. Auch solche Versuche dauerten mehrere Monate. Neben Bakterien ließen sich auch hier wieder hauptsächlich Pilze nachweisen. Die Bakterien, von denen eine kleine Zahl von den Papierstückchen oder Holzstreifchen isoliert wurde, konnten verholzte Zellwände aber ebenfalls nicht angreifen. —

Die letztgenannten Versuche gaben auch Gelegenheit, Kotklümpchen tierischer Larven zu untersuchen, welche das Holz zerfressen hatten. Diese Klümpchen wurden mikroskopiert und es zeigte sich, daß die in ihnen vorhandenen Holzteilchen alle Holzreaktionen zeigten. Wurden sie vorsichtig mazeriert, so trat die Zellulosereaktion deutlich hervor. In diesem Falle war also weder das Lignin noch die Zellulose quantitativ ausgenutzt worden. (Lit. s. oben S. 16).

Als Endergebnis aller unserer Versuche müssen wir also das Mißlingen des Nachweises von Bakterien (mit Einschluß der Aktinomyceten) verzeichnen, welche verholzte Zellwände als Stoff- und Kraftquelle benutzen können.

Weder wollte es mir gelingen, solche Spaltpilze zu finden, welche den Ligninanteil verwerten, noch auch solche, welche die Kohlehydrate, vor allem die Zellulose aus verholzten Lamellen für ihre Ernährung sich zu eigen machen können.

Damit ist aber die Frage meines Erachtens noch keineswegs erledigt; es wird darauf ankommen, mittels anderer Methoden nach solchen Formen zu suchen und auch noch anderes Impf-

material (u. a. Darmbakterien) heranzuziehen. Man wird auch mit allen möglichen verschiedenen Hölzern arbeiten müssen.

Nachdem Rubner in seinen oben genannten Versuchen eine überraschend große Ausnutzbarkeit von Haselnußschalen im Säugetierdarm festgestellt hat, sollte man u. a. auch diese zu bakteriologischen Versuchen heranziehen. Man wird weiter untersuchen, ob sich die Holzsorten, die der Chemiker als verschieden in ihrem chemischen Aufbau erkannt hat, sich auch in verschiedenem Maße biologisch resistent zeigen, man wird besonders auf die sog. „Accessorischen Stoffe" des Holzes achten müssen und untersuchen, inwiefern sie die ihnen zugeschriebene antiseptische Wirkung entfalten. —

Besonders auffallend ist mir selbst die Tatsache gewesen, daß es mir nicht gelungen ist, das Vorkommen von Bakterien nachzuweisen, welche die inkrustierte Zellulose, allgemeiner gesagt: Polysaccharide, aus der Umklammerung mit Lignin herauslösen und dann verwerten können. Die Gründe, die dafür vielleicht verantwortlich zu machen sind, sind teilweise schon oben auf S. 23 auseinandergesetzt worden:

Es könnte sein, daß die Zellulasen der Zellulosebakterien zu langsam durch das Lignin bis an die Zellulosemizellen hindurch diffundieren; umgekehrt ist auch denkbar, daß die Spaltungsprodukte der Zellulosen zu langsam durch das Lignin hindurch nach außen diffundieren — wobei besonders auch die Mittellamellen eine diffusionshemmende Wirkung entfalten dürften. Es könnte aber auch die Tatsache in Frage kommen, daß die Quellbarkeit der Zellulose und damit auch ihre Angreifbarkeit durch Enzyme behindert wird. Ob man annehmen soll, daß Lignin und Kohlehydrate chemisch miteinander verbunden sind und daß nur solche Mikroorganismen, welche diese Bindung durch Enzyme sprengen können, dadurch befähigt sind, Holz anzugreifen, muß fraglich bleiben, nachdem sehr viele chemische Forscher die Annahme einer solchen chemischen Bindung nicht für nötig halten. (s. S. 22).

Wie dem auch sei, es wird unter allen Umständen empfehlenswert sein, sich künftig nicht auf die Herstellung elektiver Rohkulturen, wie ich es getan habe, zu beschränken, sondern auch möglichst fein zerriebenes Holzpulver als Kohlenstoffquelle in Reinkulturen bekannter Zellulosebakterien, aerober, wie Cytophaga (s. S. 17) oder Cellulovibrio, oder auch anaerober zu verwenden und zu untersuchen, ob auch in solchen Kulturen die verholzte Zellulose sich unzugänglich für bakterielle Angriffe zeigt.

Literatur

(Es wurde auch die neueste Literatur, die erst nach dem Abschluß meiner Untersuchungen erschienen ist, nach Möglichkeit noch mit berücksichtigt).

Alexandrow, W. G. u. Djaparidze, L. I.: Ueber das Entholzen u. Verholzen der Zellhaut. Planta, 1927, Bd. 4, S. 467.

Bach, M.: Die Zersetzung des Stalldüngers im Boden usw. Landwirtsch. Versuchsstat., 1926, Bd. 104, S. 245.

Baker, F.: Prelimin. note on the role of cocc. microorganisms in the disintegration of cell-wall subst. Bakt. Ztb. II, 1931, Bd. 84, S. 452.

Baker, F.: Studies in the microbiology of organisms associated with the disintegration of veg. remains etc. Bakt. Ztb. II, 1933, Bd. 88, S. 17.

Baker, F. and Martin, R.: Some observations on the jodophil microflora etc. Bakt. Ztb. II, 1937, Bd. 96, S. 18.

Bamford, K. F. and Campbell, W. G.: The determination of lignin in the analysis of wood. Biochem. Journ., 1936, Vol. 30, p. 419.

Bergius, F.: Beiträge zur Theorie der Kohlenentstehung. Naturwiss., 1928, Bd. 16, S. 1.

Berl, E. u. Keller, H.: Petrograph. u. chem. Untersuchungen usw. Lieb. Ann., 1933, Bd. 501, S. 84.

Berl, E. u. Schmidt, A.: Ueber das Verhalten der Zellulose b. Druckerhitzung. Lieb. Ann., 1928, Bd. 461, S. 192.

Berl, E. und Schmidt, A.: Ueber die Entstehung der Kohle, II. Lieb. Ann., 1932, Bd. 493, S. 97.

Berl, E. u. Schmidt, A.: Ueber die Entstehung der Kohle, V. Lieb. Ann., 1932, Bd. 496, S. 283.

Berl, E., Schmidt, A. und Koch, H.: Ueber die Entstehung der Kohle. Angew. Chemie, 1932, Bd. 45, S. 517.

Boruf, C. S. and Buswell, A. M.: The anaerobic fermentation of lignin. Journ. Americ. Chem. Soc. 1934, Vol. 56, p. 886.

Brav, M. W. and Andrews, T. M. Chemische Veränderungen der Holzsubstanz während des Zerfalls. Journ. ind. and eng. chem. 1924, Vol. 16 p. 137 (Ref. im Chem. Ztb.).

Buchner, P. Der gegenwärtige Stand der neuen Symbioseforschung. Der Biologe, 1932, Bd. 2, S. 1.

Burgeff, H.: Pflanzliche Avitaminose usw. Ber. d. D. Bot. Ges 1934, Bd. 52, S. 384.

Campbell, W. G.: Durch holzzerstörende Pilze hervorgerufene chemische Reaktionen. Chem. Ztg., 1936, Bd. 60, S. 806.

Casparis, W.: Beiträge zur Kenntnis verholzter Zellmembranen. Pharm. Monatsh., 1920, Bd. 1, S. 121, 137, 153.

Cholodny, N.: Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Mikroflora. Arch. f. Mikrobiol., 1930, Bd. 1, S. 620.

Cholodny, N.: A soil chamber etc. Arch. f. Mikrobiol., 1934, Bd. 5, S. 148.

Christensen, R.: Ein Verfahren zur Bestimmung der Zellulosezersetzenden Fähigkeit des Erdbodens. Bakt. Ztb. II, 1907, Bd. 27, S. 449.

Conn, H. I.: The Cholodny Technic etc. Bakt. Ztb. II, 1932, Bd. 87, S. 233.

Czapek, F.: Ueber die sog. Ligninreaktionen des Holzes. Zeitsch. f. physiol. Chemie, 1899, Bd. 26, S. 141.

Demme, H.: Ueber den mikrobiellen Abbau verschiedener Lignine usw. Diss. Leipzig 1932.

Donath, R.: Untersuchung, Einteilung und Characteristik der Kohlen. Halle 1924.

Duthie, D. W.: Studies in tropical soils. Journ. agric. res., 1937, Vol. 27, p. 162.

Faber, F. v.: Zur Verholzungsfrage. Ber. d. Bot. Ges. 1904, Bd. 22, S. 177.

Falck, R.: Ueber korrosive und destruktive Holzzersetzung und ihre biol. Bedeutung. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesellschaft, 1919, Bd. 37, S. (8) und 1926, Bd. 44, S. 652.

Falck, R. u. Haag, W.: Lignin- und Zelluloseabbau durch Pilze. Ber. d chem. Ges. 1927, Bd. 60, S. 225.

Féher, D.: Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Bakt. Ztb. II, 1933, Bd. 88, S. 418.

Fischer, Fr.: Entstehung u. chem. Struktur der Kohle. Zeitschr. f. ang. Chemie, 1921. Bd. 34, I. S. 217.

Fischer, Fr.: Biologie und Kohle. Zeitschr. f. Angew. Chemie, 1932, Bd. 45, S. 185.

Fischer, Fr. und Lieske, R.: Untersuchungen über das Verhalten des Lignins bei der nat. Zersetzung von Pflanzen. Biochem. Ztschr., 1928, Bd. 203, S. 351.

Fischer, F. und Schrader, H.: (I) Entstehung und chemischer Struktur der Kohle. Brennstoffchemie, 1921, Bd. 2, S. 37.

Fischer, F. und Schrader, H.: (II) Entstehung und chemische Struktur der Kohle. Essen, 1921. 35 S.

Freudenberg, K., Zocher, H. u. Dürr, W.: Weitere Untersuchungen über Lignin. Ber. d. chem. Ges., 1929, Bd. 62, S. 1814.

Freudenberg, K. und Dürr, H.: Konstitution und Morphologie des Lignins. Kleins Hdb. d. Pflanzenanalyse, 3. Bd., 2. Teil, 1932, S. 125.

Freudenberg, K., Sohns, F. und Janson, A.: Weitere Untersuchung. über Lignin. 14. Lieb. Ann., 1935, Bd. 518, S. 62.

Frey-Wissling, A.: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin 1935.

Friesen, G.: Kritische Untersuchungen über den Nachweis von Ligninen in Zellwänden. Ber. d. D. Bot. Ges., 1935, Bd. 53, S. 186.

Fuchs, W.: Die Chemie des Lignins. Berlin, 1926.

Fuchs, W.: Untersuchungen über Lignin, Huminsäure u. Humin. Ges. Abh. z. Kenntn. d. Kohle, 1934, Bd. 11, S. 96.

Fuchs, W. und Horn, O.: Zur Frage der Entstehung der Steinkohle. Angewandte Chemie, 1931, Bd. 44, S. 180.

Glathe, H.: in Löhnis, Hdb. d. landwirtsch. Bakteriologie, Berlin, 1935. Bd. 2, S. 159 ff.

Grafe, V.: Untersuchungen über die Holzsubstanz vom chem. physiol. Standpunkt. Wiener Akad. 1904, Nat. Kl. Bd. 16, S. 232 u. Sitzb. Wiener Ak. Math. Nat. Kl. 1904, Bd. 113, 1, S. 25.

Gray, P. H. and Thornton, H. G.: Soil bacteria etc. Bakt. Ztb., II. 1928, Bd. 73, S. 74.

Haberlandt, G.: Der Nährwert des Holzes. Sitzb. Ak. Wiss. Berlin, 1915, XIV, S. 253.

Haberlandt, G. Mikrosk. Untersuchg. üb. Zellwandverdauung. Beitr. z. Allg. Bot., 1918, Bd. 1, S. 501.

Haberlandt G. und Zuntz, N.: Ueber die Verdaulichkeit der Zellwände des Holzes. Sitzb. Ak. Wiss. Berlin, 1915. XLI, 21. 10. 1915.

Henneberg, W.: Untersuchungen über die Darmflora des Menschen. Bakt. Ztb. II, 1923, Bd. 55, S. 242.

Hilpert, R. S. und Littmann, E.: Ligninbildung bei tiefer Temperatur. Ber. d. chem. Ges., 1934, Bd. 67, S. 1551. 1935, Bd. 68, S. 16.

Hilpert, R. S. und Hellwage, H.: Brückenlignin, ein Reaktionsprodukt usw. Ber. d. chem. Ges., 1935 Bd. 68, S. 380.

Hilpert, R. S. und Peters, O.: Direkte Umwandlung der Gerüstsubstanz des Strohs usw. Ber. d. chem. Ges., 1935, Bd. 68, S. 1575.

Hilpert, R. S. und Wagner, R.: Ueber das scheinbare Lignin und die Gerüstsubstanz der Pflanzenblätter. Ber. d. chem. Ges., 1935, Bd. 68, S. 371.

Hoagland, R.: Mineral nutrition of plants. Ann. rev. Biochem. 1932. Vol. I, p. 618.

Huber, H.: Ueber den Zustand u. d. Rolle des Gerbstoffs i. d. Pflanze. Jahrb. f. wiss. Bot., 1929, Bd. 70, S. 278.

Janke, A. und Wozak, M.: Mikrobiol. Unters. im Lunzer Gebiet. Arch. f. Mikrob. 1934, Bd. 5, S. 338.

Jensen, H .L.: The genus Micromonopora etc. Proc. Linn. Soc. N. S. Wales, 1930, Vol. 15, p. 231.

Kalb, L.: Analyse des Lignins. Kleins Handb. d. Pflanzenanalyse, 3. Bd., 2. Teil, 1932, S. 156 u. S. 1457.

Kisser, K.: In Abderhaldens Hdb. d. biol. Arbeitsmethoden. 1931, S. 285—330.

Kisser, K.: und Lettmayr, K.: Absortionsversuche an Sägespähnen. Zeitschr. f. Pflanzenernährg., 1933, A. Bd. 29, S. 189.

Lieske, R.: Untersuchungen zur Theorie der Entstehung der Faserkohle. Brennstoffchemie, 1929, Nr. 10, S. 6.

Lieske, R.: Bemerkungen zur Lignintheorie etc. Brennstoffchemie 1930, Nr. 5, Sepz. Abz.

Lieske, R., Ueber das Vorkommen von Bakterien in Kohlenflözen. Biochem. Ztschr., 1932, Bd. 250, S. 339.

Lieske, R.: Biologie und Kohlenforschung. Der Biologe, 1934, Bd. 3, S. 119.

Lieske, R. und Hofmann, E.: Untersuchungen über die Mikrobiologie der Kohlen. I. Mikroflora der Braunkohlengruben. Brennstoffchemie, 1928, Bd. 9, S. 282.

Lieske R. und Hofmann, E.: Untersuchungen über den Bakteriengehalt in großen Tiefen. Bakt. Ztb. II, 1929, Bd. 77, S. 305.

Lieske, R. und Winzer, K.: Neue Untersuchungen zur Lignintheorie. Brennstoffchemie, 1931 Bd 12, S. 205.

Lipman, C. B.: Further evidence of the amazing longevity of bacteria in coals. Science, 1934, Vol. 79, p. 230.

Lüdtke, M.: (I) Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran. II. Ber. d. chem. Ges. 1928, S. 465.

Lüdtke, M.: (II) Zur Kenntnis der pflanzlichen Zellmembran, IV. Lieb. Ann., 1928, Bd. 466, S. 27.

Lüdtke, M.: Untersuchungen über Aufbau und Bildung der pflanzlichen Zellmembran usw. Biochem. Zeitschr., 1931, Bd. 233, S. 1.

Lüers, H.: Die Holzverzuckerung. Forschungsdienst, 1936, Bd. 2, S. 112.

Malenkovic, N.: Ist Holz durch Bakterien vergärbar? Ztschr. f. d. landwirtsch. Versuchswesen in Oesterr., 1905, S. 852.

Mäule, C.: Das Verhalten verholzter Membranen gegen $KMnO_4$. etc. Hab. Schrift, Stuttgart, 1901.

Marcusson, J.: Lignin und Oxyzellulose-Theorie. Angew. Chemie. 1925. Bd. 38, S. 339, 1926, Bd. 39, S. 898 und 1927, Bd. 40, S. 48.

Meyer, K. H. und Mark, H.: Ueber den Bau der krist. Anteile der Zellulose. Ber. d. chem. Ges., 1928, S. 593.

Molisch H.: Die Bedeutung des Lignins für die Pflanzen. Zeitschr. f. Bot., 1932, Bd. 25, S. 583.

Müller, W.: Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. Arch. f. Mikrob., 1934, Bd. 5, S. 84.

Norman, A. G.: (I) The composition of crude fibre etc. Journ. agric. Sc., 1935, Vol. 25, p. 529.

Norman, A. G.: (II) The decomposition of lignin in plant materials. Trans. Internat. Congr. soil Sc. 1935, Vol. 3, p. 105 (nicht gesehen).

Norman, A. G.: Scient. progr. 1936, Vol. 30, p. 442 (nicht gesehen).

Oberholzer, P. C. J.: Decompos. of organ. mat. in relat. to soil fertil. in arid and semi-arid regions. Soil Sc., 1936, Vol. 40, p. 359.

Page, H. J.: Studies on the C- and N-cycles in the soil. V. Journ. agr. Sc., 1932, Vol. 22, p. 291.

Paloheimo, L.: Die Verwendung der Säurehydrolyse zur Ligninbestimmung. Bioch. Ztschr. 1925, Bd. 165, S. 463.

Paloheimo, L.: Beiträge zur Ligninbestimmung mittels Säurehydrolyse. Biochem. Ztschr., 1929 Bd. 214, S. 161.

Phillips, M., Weihe, H. D. and Smith, N. R.: The decomposition of lignin materials by microorganisms. Soil Sc., 1930, Vol. 30 p. 383.

Phillips, M., Goss, M. J., Beavens, E. A. and James, L. H.: Microbiol. decomp. of alfalfahay. Journ. agric. res., 1935, Vol. 50, p. 761. cf. auch Journ. Americ. Chem. Soc., 1934, Vol. 56, p. 886 und Chem. Rev., 1934, Vol. 14, p. 103.

Pierantoni, U.: Arch. zool. Ital. 1936, T. 22, p. 135, zit. nach Fortschr. d. Bot., 1937, Bd. 6 S. 343.

Porges, N. Chemical composition of Aspergillus niger as modified by $ZnSO_4$ Bot. Gaz. 1933, Vol. 94, p. 197.

Potter, M. C.: On the occurence of Cellulose in the xylem etc. Ann. of Bot., 1904, Vol. 18, p. 121.

Pringsheim, H. und Fuchs, W.: Ueber den bakteriellen Abbau der Ligninsäure. Ber. d. chem. Ges., 1923, Bd. 56, S. 2095.

Rahn, H.: Untersuchungen über den N-Stoffwechsel pflanzlicher veg. Speicherorgane. Planta, 1933, Bd. 13, S. 1.

Rippel, A.: Vorlesungen über Bodenmikrobiologie. Berlin 1933, S. 36.

Rippel, A.: Neuere mikrobiol. Beobachtungen z. Humusbildung. Forschungsdienst, 1936, Bd. 2, S. 83.

Robbins, W. J. and Lathrop, G. C.: The Oxydation of Vannillin etc. Soil Sc. 1891, Vol. 7, p. 475.

Rose, R. E. and Lisse, M. W.: Chemie des Holzzerfalls. Journ. ind. and eng. chem., 1917, Vol. 9 p. 284.

Rubner, M.: Ueber die Verdaulichkeit der Haselnußschalen. Arch. f. Anat. u. Phys., Abt. Phys., 1916, 15. Jahrg., S. 281 ff.

Ruschmann, G.: Die Zersetzung pflanzlicher und tierischer Rückstände usw. Forschungsdienst, 1936, Bd. 2, S. 245.

Sandhoff, H.: Kühn-Archiv, 1931, Bd. 38, S. 101.

Sanio, C. G.: Einige Bemerkungen über den Bau des Holzes. Bot. Ztg. 1860, Bd. 18.

Scheffer, F.: Ueber den chemischen Aufbau der Humuskörper. Forschgsdienst., 1936, Bd. 1, S. 422.

Schindler, H.: Kritische Bemerkungen zur Kenntnis der sog. Holzreaktionen. Zeitschr. f. wiss. Mikr., 1932, Bd. 48, S. 289.

Schrader, H.: Ueber das Verhalten von Zellulose, Lignin, Holz und Torf gegen Bakterien. Ges. Abh. z. Kenntn. d. Kohle, 1923, Bd. 6, S. 173.

Schropp, W. und Scharrer, K.: Wasserkulturen mit der A-Z-Lösung. Jahrb. f. wiss. Bot., 1933, Bd. 78, S. 544.

Schroeder, H.: The bacterial content of coal. Bakt. Ztb. II, 1914, Bd. 41, S. 460.

Schulz, G.: Der Einfluß einiger Schwermetallsalze auf die chemische Zusammensetzung von Aspergillus niger. Planta, 1937, Bd. 27, S. 196.

Schwartz, H.: Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. Arch. f. Mikrob., 1932, Bd. 3, S. 453.

Siersch, E.: Vergleichende Versuche über die Mäule- und Phlorogluzinreaktion beim Nachweis der Verholzung. Mikrochemie, 1926, Bd. 5, S. 188.

Simon, K.: Neue Arbeiten über das Lignin. Forschgsdienst, 1936, Bd. 1. S. 452.

Singer, M.: Beiträge zur näheren Kenntnis der Holzsubstanz etc. Sitzb. Wiener Akad. 1882, Bd. 85, I. Abt., S. 414.

Springer, U.: Ist der Begriff Humussäure heute noch berechtigt? Zeitschr. f. Pflanzenernährg., 1934, Bd. 35, S. 334. S. auch: eod. loco 1935 Bd. 37, S. 202.

Springer, U.: Die heutigen Methoden der Humusuntersuchung usw. Forschgsdienst, 1936, Bd. 2, S. 73.

Stapp, C. und Bortels, H.: Mikrobiol. Unters. üb. d. Zersetzg. v. Waldstreu. Bakt. Ztb. II, 1934, Bd. 90, S. 28.

Storch, A.: Hydrolyse von Fichten- und Buchenholz. Ber. d. chem. Ges., 1935, Bd. 68, S. 2367.

Taylor, E.: Base exchange and the formation of coal. Nature, 1927, Vol. 120, p. 448.

Tenney, F. G. and Waksman, S. A.: Compos. of nat. organ. materials etc., IV. Soil Sc., 1929, Vol. 28, p. 55.

Terres, E.: Beitr. z. Frage d. Entstehg. d. Kohlen. Angew. Chemie, 1935, Bd. 48, S. 160.

Tropsch, H.: Die chemischen Vorgänge bei der Entstehung der Kohlen. Naturwiss., 1927, Jahrg. 15, S. 474.

Tunmann-Rosenthaler: Pflanzenmikrochemie, 2. Aufl., Berlin 1931.

Ungar, E.: Beitr. z. Kenntn. d. verholzten Faser. Diss. Zürich 1916.

Waksman, S. A.: The origin and nature of the soil organ. matter etc. III. Soil Sc., 1926, Vol. 22, p. 323.

Waksman, S. A.: (I) Princ. of soil microbiol. Baltimore, 1927.

Waksman, S. A.: (II) Die Natur des organischen Erdbodenbestandteils und die Rolle von Mikroorganismen bei seiner Zersetzung. Naturwiss. 1927, Bd. 15, S. 689.

Waksman, S. A.: Decomposition of the various chemical constitutents of complex plant materials etc. Arch. f. Mikrobiol., 1931, Bd. 2, S. 136.

Waksman, S. A.: Der Platz der Huminsäure in der Chemie des Humus. Zeitschr. f. Pflanzenernährg., 1935, Bd. 37, S. 52.

Waksman, S. A.: Humus, chemical composition, origin and importance in nature. Baltimore 1936.

Waksman, S. A. and Hutchings, I. J.: Preservation of soil nitrogen. Soil Sc., 1935, Vol. 40, p. 487.

Waksman, S. A. and Hutchings, I. J.: Decomposition of lignin by microorganisms. Soil Sc., 1936, Vol. 42, p. 119—130.

Waksman, S. A. and Iyer, K. R. N.: Contribution to our knowledge of the chemical nature and origin of humus I—IV. Soil. Sc. 1932, Vol. 34, p. 43, 71 1933, Vol. 36, p. 57, 69.

Waksman, S. A. and Smith, H. W.: Umwandlung der Methoxylgruppe des Lignins usw. Journ. Am. chem. Soc. 1934, Vol. 56, p. 1225. Ref. Zeitschr. f. Pflanzenernährg., 1935, Bd. 40, S. 115.

Waksman, S. A. and Stevens, K. R.: Contributions to the chem. composition etc. Soil. Sc., 1928, Vol. 26, p. 113; s. auch p. 239, und 1929, Vol. 28, p. 315.

Waksman, S. A. and Tenney F. G.: The composition of nat. org. matter etc. I. Soil Sc., 1927, Vol. 24, p. 275.

Waksman, S. A. and Tenney, F. G.: The compos. of nat. org. matter etc. III. Soil Sc., 1928, Vol. 26, p. 155.

Waksman, S. A., Tenney, F. G. and Stevens, K. R.: The rôle of microorganisms in the transformat. of organ matter in the forest soils. Ecology, 1928, Vol. 9, p. 126.

Wassink, E. C.: Begrenzende Bedingungen bei der Atmung von Phycomces. Rec. trav. Bot. Néerl. 1934, **31,** S. 583.

Wedekind, E.: Der Streit um die Existenz des Lignins. Forschgsdienst., 1936, Bd. 2, S. 148.

Wehmer, C.: Die chemische Wirkung des Hausschwammes auf die Holzsubstanz. Ber. d. D. Bot. Ges., 1914, Bd. 32, S. 601.

Wehmer, C.: Zum Abbau des Holzes durch Pilze. Ber. chem. Ges. 1921. Bd. 48, S. 130.

Wehmer, C.: Versuche über Umwandlung von Lignin und Zellulose in Kohle. Brennstoffchemie, 1925, Bd. 6, S. 101.

Weyland, H.: Die chemischen Vorgänge bei der Entstehung der Kohlen. Natw., 1927, Jahrg. 15, S. 327 u. 625.

Wisselingh, H. v.: Die Zellmembran. Hdb. d. Pflanzenanatomie, Bd. III, 2. 1925, S. 90 ff.

Woodman, H. E.: and Stewart, J.: The mechanism of cell digestion. Journ. agric. Sc., 1932, Vol. 22, p. 527.

Zetzsche, F.: Fossile Pflanzenstoffe. Kleins Hdb. d. Pflanzenanalyse, 3. Bd., 2. Teil, 1932, S. 293.

Lebenslauf.

Am 28. Juli 1908 wurde ich als Sohn des Weingutsbesitzers Heinrich Bauer IV zu Sponheim bei Bad Kreuznach geboren. In Bad Kreuznach erlangte ich 1930 das Reifezeugnis des humanistischen Gymnasiums. Ich studierte die Naturwissenschaften, besonders Botanik an den Universitäten zu München, Bonn und Münster i. W.

Meine akademischen Lehrer in Botanik waren die Herren Professoren bzw. Dozenten Benecke, Fitting, Hannig, Mevius, Roberg, Schratz und Simon.

Allen meinen verehrten Lehrern möchte ich meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

Aloys Bauer.